

# **Entwicklung schneller chromatographischer Methoden für komplexe Polymere**

Dem Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

**Adele Brüll (geb. Pienaar)**  
aus Colesberg, Südafrika

Berichterstatter:	PD Dr. H. Pasch
Mitberichterstatter:	Prof. F. Müller-Plathe
Tag der Einreichung:	13.03.2006
Tag der mündlichen Prüfung:	24.04.2006

Darmstadt 2006

D17

*Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes*

Herrn Priv.-Doz. Dr. Harald Pasch, danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für anregende Diskussionen und für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Polymer Laboratories (Dr. Greg Saunders), Polymer Standards Service (Peter Kilz, Dr. Thorsten Hofe) und Merck (Dr. Karin Cabrera) für die Bereitstellung der Säulen. Dr. Frank Rittig für die Bereitstellung der Proben.

Dr. Wolf Hiller für die LC-NMR-Kopplung, die interessanten Diskussionen rund um die NMR-Technik. Dr. Wolfgang Radke für die fruchtbaren Diskussionen, die Kreativität bei der Interpretation der Ergebnisse und die stete herzliche Hilfsbereitschaft.

Mein Dank allen Mitarbeitern des Deutschen Kunststoff-Instituts (Abteilung Analytik), die zur Durchführung dieser Arbeit mit einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben.

Besonders erwähnen möchte ich Martina, Christel, Christoph, Daniela, Marco, Christian, Wolfgang und Birgit für die vielen lustigen Momente, den Spaß bei der Arbeit und die Gespräche im Kaffeeraum auch außerhalb der Chemie

Robert

Diese Arbeit wurde im Deutschen Kunststoff-Institut unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. H. Pasch in der Zeit von Januar 2003 bis Februar 2006 durchgeführt.

### Veröffentlichungen

H. Pasch, A. Brüll, K. Cabrera

*Fast HPLC analysis of poly(ethylene oxide)s for high-throughput experimentation*  
e-polymers 20/2005

W. Hiller, A. Brüll, D. Argyropoulos, E. Hoffmann, H. Pasch

*HPLC-NMR of fatty alcohol ethoxylates*

Magnetic Resonance in Chemistry 43 (2005) 729

M.A. Bashir, A. Brüll, W. Radke

*Fast determination of critical Eluent composition for polymers by gradient chromatography*

Polymer 46 (2005) 3223

H. Pasch, A. Brüll, M.A. Bashir,

*Development of a Fast Gradient Separation for Different Methacrylates*  
e-polymers eingereicht

### Poster:

Adele Pienaar, H. Pasch, P. Kilz

*Fast Chromatography of Synthetic Polymers*

17th Bratislava International Conference on Macromolecules, Bratislava, Slovakia  
24. - 28. August 2003

Adele Pienaar, Harald Pasch, Peter Kilz\*

*Column Screening for fast Chromatography of Synthetic Polymers*

7th Annual UNESCO Introductory Course & UNESCO/IUPAC Conference on  
Macromolecules with special sessions on Polymers in Medicine, Nanotechnology,  
Degradation & Stabilization. Stellenbosch, South Africa, 5. - 8. April 2004

### Vortrag

Adele Brüll, Harald Pasch, Peter Kilz

*Column Screening for Fast Chromatography of Synthetic Polymers*

Second International Symposium on Separation and Characterization of Natural  
and Synthetic Macromolecules (SCM-2). Amsterdam, 2. – 4. Februar 2005

## Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Einleitung</b>	1
2.	<b>Theoretische Grundlagen</b>	5
2.1	Flüssigchromatographie von Polymeren	5
2.2	Leistungsbewertung von chromatographischen Trennphasen	12
2.3	Schnelle Flüssigchromatographie von Polymeren	15
2.4	Einflussfaktoren der schnellen Chromatographie	17
2.5	Monolithische stationäre Phasen	18
3.	<b>Entwicklung von Methoden für die schnelle Größenausschlusschromatographie (SEC)</b>	22
3.1	Schnelle SEC in Tetrahydrofuran (THF)	22
3.2	Schnelle SEC in Dimethylacetamid (DMAc)	30
3.3	Schnelle SEC in Wasser	37
4.	<b>Schnelle kritische Chromatographie (LC-CC) von Polyethylenoxiden</b>	43
4.1	Isokratische Methoden	47
4.2	Gradientenmethoden	56
4.3	Vergleich von unterschiedlichen stationären Phasen	59
5.	<b>Schnelle Adsorptionschromatographie (LAC) von Polyethylenoxiden</b>	62
5.1	RP-Chromatographie in Acetonitril-Wasser	63
5.2	NP-Chromatographie in <i>n</i> -Propanol-Wasser	65
5.3	LC-NMR-Kopplung	72
5.4	LC-CC-LAC-Kopplung (2D-Chromatographie)	75

6.	<b>Schnelle chromatographische Verfahren für EO-PO-Blockcopolymere</b>	79
6.1	Kritische Bedingungen für PPO auf einer unpolaren stationären Phase	81
6.2	Kritische Bedingungen für PEO auf einer polaren stationären Phase	85
7.	<b>Zusammenfassung</b>	92
8.	<b>Experimenteller Teil</b>	95
8.1	Chromatographische Systeme	95
8.2	Säulen	95
8.3	Lösungsmittel für die Chromatographie	96
8.4	Polymerstandards	96
8.5	Proben	96
8.6	Bestimmungen mittels MALDI-ToF-MS	97
9.	<b>Literatur</b>	98

### Verwendete Abkürzungen und Symbole

2D	zweidimensional
$\sigma$	Varianz
$\mu$	lineare Fließgeschwindigkeit
$\Delta G$	freie Gibbs-Energie
$\Delta H$	Änderung der Enthalpie
$\Delta S$	Änderung der Entropie
$[\eta]$	Grenzviskosität
AcN	Acetonitril
CCD	chemische Heterogenität (chemical composition distribution)
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CMR	kombinatorische Materialforschung
D	Steigung der SEC-Kalibrierkurve
DMAc	Dimethylacetamid
$d_p$	Partikelgröße
EO	Ethylenoxid
EO-b-PO	Ethylenoxid-Propylenoxid- Blockcopolymer
$F_c$	Flussrate
FTD	Funktionalitätsverteilung (Functionality Type Distribution)
$H$	Bodenhöhe
HETP /H	theoretischer Boden (Height equivalent of a theoretical plate)
I.D.	Säuleninnendurchmesser
<i>i</i> Prop	<i>iso</i> -Propanol
$K_d$	Verteilungskoeffizient
L	Säulenlänge in cm
LAC	Adsorptionschromatographie (liquid adsorption chromatography)
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LC-CC	Chromatographie unter kritischen Bedingungen (liquid chromatography at critical conditions)
LSS	linear solvent strength

## Verwendete Abkürzungen und Symbole

---

M	Molmasse
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization,
MeOH	Methanol
MMD	Molmassenverteilung (molar mass distribution)
$M_w$	gewichtsmittlere Molmasse
N	Bodenzahl
NMR	Kernspinresonanz
NP	Normalphase
$N_{th}$	theoretische Bodenzahl pro Meter
P	Peak-Kapazität
$P_x$	Oligomerisierungsgrad
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PPG	Polypropylenglycol
PPO	Polypropylenoxid
RI	Brechungsindex
RP	Umkehrphase
SEC	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography)
T	Säulentemperatur
$t_0$	Totzeit
$t_g$	Gradientenzeit
THF	Tetrahydrofuran
ToF	Time of Flight
V	Volumen der stationären Phase
$V_i$	Zwischenkornvolumen
$V_R$	Retentionsvolumen
$w_{1/2}$	Halbwertsbreite



## 1 Einleitung

Die makroskopischen Eigenschaften synthetischer Polymere werden durch ihre chemische Zusammensetzung, die Zusammensetzungsverteilung (chemical composition distribution, CCD), die durchschnittlichen Molmassen, die Molmassenverteilung (molar mass distribution, MMD), die Funktionalitätsverteilung (functionality type distribution, FTD), Endgruppen und die Architektur bestimmt. Homopolymere sind Polymere, die aus nur einer Monomerart aufgebaut sind und eine Verteilung in den Molmassen der Makromoleküle zeigen. Bei Copolymeren wie Block-, Pfropf- oder statistischen Copolymeren, die aus zwei oder mehr verschiedenen Monomeren synthetisiert werden, liegt zusätzlich eine chemische Heterogenität vor. Bedingt durch unterschiedliche Copolymerisationsparameter werden die Monomere in unterschiedlicher Sequenzabfolge in die Polymerketten eingebaut. Hieraus resultiert eine Verteilung der chemischen Zusammensetzung. Bei der Synthese können zusätzlich verschiedene funktionelle Endgruppen entstehen, wodurch sich eine Verteilung der Funktionalitäten ergibt. Darüber hinaus können Polymere eine unterschiedliche molekulare Architektur aufweisen, d.h. sie können z.B. linear, verzweigt oder sternförmig vorliegen. Die Vielfalt der Struktur von Polymeren bezüglich der Molmasse, der chemischen Zusammensetzung, der Funktionalität und der molekularen Architektur lässt sich unter dem Begriff der molekularen Heterogenität zusammenfassen (Abb. 1.1).

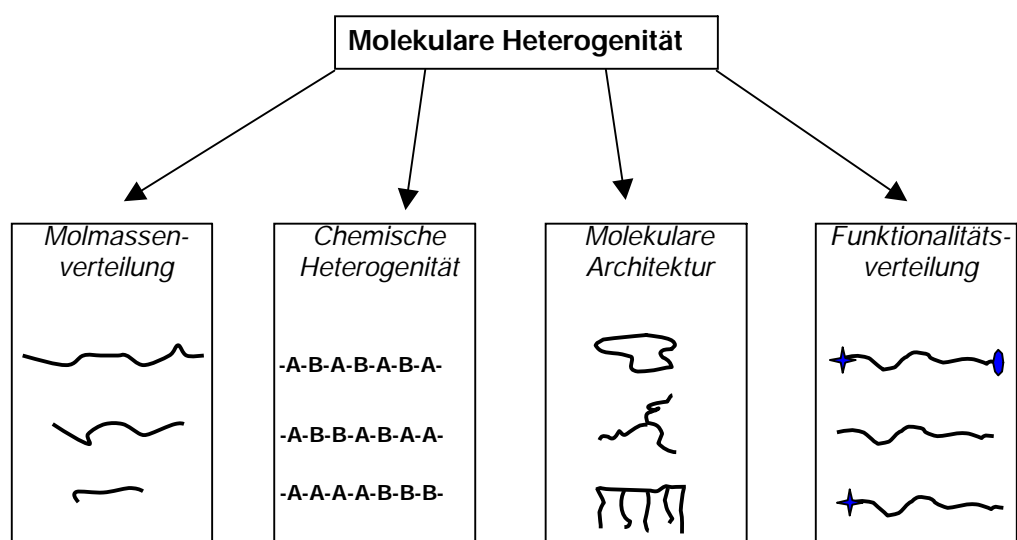


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der molekularen Heterogenität von Polymeren

Zur Analyse der bei der Synthese erhaltenen Produkte und zur Erstellung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen ist eine Analyse der im Polymer vorliegenden molekularen Heterogenität unabdingbar.

Polyethylenoxide (PEOs) gehören zu den wichtigsten hydrophilen Polymeren. PEOs werden durch Ethoxylierung von Fettalkoholen, Alkylphenolen oder mehrwertigen Alkoholen hergestellt und haben u.a. folgende Anwendungen:

- reaktive Komponente bei der Herstellung von Polyestern und Polyurethanen
- Wirkstoffträger in allen Bereichen von galenischen Zubereitungen in der pharmazeutischen Industrie
- kosmetische Präparationen wie z.B. in Cremes und Lotionen, Parfüms, Deodorants, Lippenstiften, Zahnpasten, Haarpflegemitteln, Badezusätze
- Gleit- und Formtrennmittel, Vulkanisationsaktivatoren oder Wärmeüberträger bei der Produktion von Gummiartikeln
- Plastifizierungs- und Bindemittel für keramische Pressmassen
- Zusätze zu Waschmitteln (Tenside)
- Weichmacher und Feuchthaltemittel z.B. für Klebstoffe

Eine der wichtigsten Eigenschaften von PEOs ist ihre Hydro- bzw. Lipophilie. In Abhängigkeit von der Länge der Ethoxylatkette und der chemischen Struktur der Endgruppen sowie deren Anzahl ändert sich der amphiphile Charakter und damit die Oberflächenaktivität. Aus diesem Grunde ist es wichtig, neben der Molmassenverteilung auch die Funktionalitätsverteilung zu kennen. Durch die Anwendung der kritischen Chromatographie<sup>1,2</sup> ist es möglich, Fettalkoholethoxylate nach ihren Endgruppen aufzutrennen. Diese Trennung wird normalerweise auf einer C<sub>18</sub>-Säule mit einem Lösungsmittelgemisch von Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser durchgeführt. Die Trennung erfolgt ausschließlich nach Endgruppen und unabhängig von der Molmasse. Auf C<sub>18</sub>-Säulen mit typischen Säulendimensionen von 250 mm und 4.8 mm Innendurchmesser beträgt die Analysenzeit bei einem Fluss von 1 ml/min 140 Minuten.

Zur Beschleunigung von chromatographischen Messungen z.B. in der Prozess- oder Qualitätskontrolle ist eine Verkürzung dieser Analysenzeiten erforderlich. Insbesondere jedoch in der kombinatorischen Materialforschung, die innerhalb kürzester Zeit große Probenmengen generiert, ist eine Erhöhung des Probendurchsatzes unabdingbar. In der pharmazeutischen Kombinatorik, bei der die Chromatographie zur Identifizierung oder Reinheitsuntersuchung niedermolekularer Wirkstoffe eingesetzt wird, konnten chromatographische Methoden erheblich beschleunigt werden<sup>3,4</sup>. Im Gegensatz dazu besteht bei der schnellen Chromatographie von synthetischen Polymeren großer Forschungsbedarf. Eine Möglichkeit, die Analysenzeit pro Probe zu verkürzen, besteht in der Erhöhung der Flussrate und einer Verkleinerung der Säulendimensionen. Da Letztere jedoch nicht unbegrenzt reduziert werden können, ist es für weitere Zeitersparnisse erforderlich, zusätzlich neue stationäre Phasen zu entwickeln. Dies können stationäre Phasen mit sehr kleinen Korngrößen oder völlig neue chemische Strukturen sein. Derartige Materialien erlauben es, bei hoher Trennleistung die Flussrate weiter zu erhöhen und so die Analysenzeit nochmals zu reduzieren.

Erste wesentliche Arbeiten zur Beschleunigung von Polymertrennungen wurden seit den 90er Jahren durchgeführt. 1999 berichteten Pasch und Kilz über die SEC-Trennung von Polystyrolproben in einem Zeitraum von 2 Minuten mittels Hochdurchsatzsäulen<sup>5</sup>. Die Autoren beschrieben auch die Trennung von PEO nach der Funktionalität in 6 min auf kleinen Säulen mit verbesserter Trennleistung. Im Weiteren gelang es, Epoxidharze in 2 min nach der Funktionalität zu trennen. Svec et al.<sup>6-9</sup> berichteten zwischen 1996 und 2001 über die Untersuchung der Molmassenverteilung von Polystyrol, Polymethacrylat, Polyvinylacetat und Polybutadien durch Fällungs-Lösungschromatographie auf monolithischen Polymerphasen in 2 min unter Anwendung eines THF/Wasser Gradienten. Schubert<sup>4</sup> berichtete 2004 über die schnelle SEC von Polymeren (PS) auf Säulen der Dimension 100 x 10 mm I.D.

Knecht<sup>10</sup> gelang es, die schnelle 2D-Chromatographie sowohl in organischen als auch wässrigen Systemen durchzuführen. Durch Variation der Flussrate gelang es ihr, den Zeitbedarf für eine 2D-Messung auf ca. 70 min zu reduzieren. Adler<sup>11</sup> beschreibt weitere Parameter, die es ermöglichen, die 2D-Chromatographie zu beschleunigen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Entwicklung und Bewertung von schnellen SEC-Methoden zur Molmassenbestimmung von Polystyrol in THF, Methacrylsäurehaltigen Copolymeren in stark polaren Eluenten und Polystyrolsulfonaten in wässrigen Medien. Bei der Bewertung soll neben der Zeitersparnis insbesondere die Genauigkeit der Kalibrationskurven und der gemessenen Molmassen betrachtet werden.
- Übertragung bestehender analytischer Methoden für PEOs (z.B. zur Bestimmung der Funktionalitätsverteilung durch LC-CC) auf umdimensionierte, kommerziell verfügbare stationäre Phasen unter Erhöhung der Flussrate. Dabei soll schwerpunktmäßig der Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung und Auflösung untersucht werden.
- Entwicklung von schnellen analytischen Methoden zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von PEOs. Dazu soll der Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung untersucht werden. Zur umfassenden Charakterisierung der PEOs sollen geeignete mehrdimensionale Trennverfahren entwickelt werden.
- Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung von Blockcopolymeren aus Ethylenoxid und Propylenoxid. Dabei soll die individuelle Blocklänge mittels geeigneter chromatographischer Trennmodi ermittelt werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Flüssigchromatographie von Polymeren

Polymere sind heterogen aufgebaut und ihre Eigenschaften hängen von der molekularen Struktur ab, die durch die Molmassenverteilung (molar mass distribution, MMD), die funktionellen Gruppen und deren Verteilung, die Architektur sowie die chemische Heterogenität (chemical composition distribution, CCD) beschrieben wird (Abb. 1.1). Diese Verteilungen liegen jedoch nicht unabhängig voneinander vor, sondern überlagern sich.

Zum Auftrennen von komplexen Polymeren wird die Flüssigchromatographie eingesetzt. Die Trennung basiert auf den unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichten der einzelnen Probenbestandteile zwischen der stationären und der mobilen Phase. Thermodynamisch ist jede chromatographische Trennung mit einer Änderung der freien Gibbs-Energie,  $\Delta G$ , der gelösten Moleküle verbunden. Diese Änderung kann sowohl auf der Änderung der Entropie,  $\Delta S$ , als auch auf der Änderung der Enthalpie,  $\Delta H$ , basieren (Gl. 2.1)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_d \quad (2.1)$$

Die Entropieänderung resultiert aus Konformationsänderungen der gelösten Moleküle beim Eindringen in die Poren und bei Adsorptionsvorgängen an der Oberfläche der stationären Phase. Die Enthalpieänderung wird im Wesentlichen durch Coulomb-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte verursacht.  $K_d$  ist der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen der stationären und der mobilen Phase.

Das Elutionsvolumen,  $V_R$ , einer Substanz ergibt sich aus der chromatographischen Grundgleichung (Gl 2.2).

$$V_R = V_i + V K_d \quad (2.2)$$

$V_i$  ist das Zwischenkornvolumen und  $V$  das für die Trennung wirksame Volumen der stationären Phase.  $K_d$  lässt sich als Produkt der Verteilungskoeffizienten für die Größenausschluss-chromatographie (size exclusion chromatography, SEC) und die Adsorptionschromatographie (liquid adsorption chromatography, LAC) formulieren.

$$K_d = K_{SEC} \cdot K_{LAC} \quad (2.3)$$

Nach welchem Modus der Flüssigchromatographie eine Substanzmischung getrennt wird, hängt von den chromatographischen Bedingungen ab, die durch die Verwendung verschiedener stationärer und mobiler Phasen in einem weiten Bereich variiert werden können.

Die ideale SEC ist ein rein entropischer Prozess und trennt nach dem hydrodynamischen Volumen der Moleküle, das vor allem eine Funktion der Molekülgröße ist. Die Trennung beruht auf dem Prinzip der begrenzten Verteilung der Solutmoleküle zwischen dem Zwischenkornvolumen und dem Porenvolumen der Säule. Der Trennbereich der SEC wird durch das den Molekülen zugängliche Porenvolumen der Säule bestimmt, deren Packungsmaterial z.B. aus gequollenem, mit Divinylbenzol vernetztem Polystyrol mit einem großen Porenvolumen besteht. Kleinere Moleküle haben mehr Porenvolumen zur Verfügung, in das sie ungehindert eindringen können, während große Moleküle nur in Poren mit großem Durchmesser eindringen können. Letztere eluieren daher zuerst (bei kleinerem Elutionsvolumen) während kleinere Moleküle später eluieren (größeres Elutionsvolumen). Da die SEC eine Relativmethode zur Molmassenbestimmung ist, muss eine Kalibrierung erfolgen. Dies geschieht am zweckmäßigsten mittels engverteilter Polymerstandards mit bekannter Molmasse. Die hieraus erstellte Kalibrierkurve, die durch Auftragen des Logarithmus der Molmasse gegen das Elutionsvolumen erhalten wird, gilt streng genommen nur für das zur Eichung verwendete Polymere, da verschiedene Polymere bei gleicher Molmasse unterschiedliche hydrodynamische Volumina besitzen. Dies wird beim Vergleich der Kalibrierkurven von chemisch verschiedenen Polymeren deutlich, die sich

zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. Um die Notwendigkeit der Kalibrierung für jedes Polymer zu umgehen, kann in einigen Fällen die von Benoit et. al.<sup>12</sup> entwickelte universelle Kalibrierung angewendet werden, mit der man die Kalibrierkurve eines Polymeren auf ein anderes umrechnen kann. Das Produkt aus intrinsischer Viskosität  $[\eta]$  und Molmasse  $M$ , das ein Maß für das hydrodynamische Volumen ist, ergibt bei einer Auftragung gegen das Elutionsvolumen für unterschiedliche Polymere eine einzige Kurve. Damit haben zwei verschiedene Polymere mit gleichem Elutionsvolumen das gleiche hydrodynamische Volumen.

$$[\eta]_1 M_1 = [\eta]_2 M_2 \quad (2.4)$$

Über die Kuhn-Mark-Houwink-Beziehung<sup>13</sup> (Gl. 2.5) ist die Molmasse mit der intrinsischen Viskosität verknüpft und bei Kenntnis der substanzspezifischen Konstanten  $K$  und  $a$  für zwei unterschiedliche Polymere lassen sich die Kalibrierkurven und die Molmassen von einem Polymeren auf ein anderes umrechnen.

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (2.5)$$

Die Gültigkeit dieser universellen Kalibrierung wurde in vielen Untersuchungen mit unterschiedlichen Polymeren und Lösungsmitteln bestätigt.

Bei der idealen Adsorptionschromatographie (LAC) erfolgt die Trennung ausschließlich durch adsorptive Wechselwirkungen zwischen den Solutmolekülen und der stationären Phase, die zumeist aus Kieselgel oder oberflächenmodifiziertem Kieselgel besteht. Es stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen den an der Oberfläche der stationären Phase adsorbierten und den in der mobilen Phase gelösten Makromolekülen ein, weshalb für eine Trennung die Größe und die chemische Struktur der Oberfläche entscheidend sind. Die Solutmoleküle werden bei der LAC nach ihrer Polarität, also nach ihrer chemischen Struktur, getrennt.

Für Homopolymere ergibt sich die Elutionsreihenfolge aus der Traubeschen Regel<sup>14</sup>, die besagt, dass Moleküle mit längerer Kettenlänge später eluiert werden als solche mit kürzerer Kettenlänge. Da bei Molekülen mit größerer Kettenlänge die Anzahl der funktionellen Gruppen (wenn diese mit der Anzahl der Wiederholungseinheiten korrelieren), die mit der stationären Phase wechselwirken wächst, steigt  $\Delta H$  und die Moleküle werden stärker zurückgehalten. Dies führt jedoch bei hochmolekularen Polymeren recht schnell zur irreversiblen Adsorption an der stationären Phase. Bei Copolymeren ist durch die unterschiedliche Stärke der Wechselwirkungen der einzelnen Monomereinheiten in der Kette eine Trennung nach den Anteilen der einzelnen Monomeren in der Kette möglich, jedoch unter Berücksichtigung des zuvor beschriebenen Molmasseneinflusses.

Bei den genannten Trennmechanismen hängt der Trennmodus davon ab, welche Wechselwirkungen überwiegen. Sind die entropischen Wechselwirkungen stärker als die enthalpischen, ist der Term  $T\Delta S$  größer als  $\Delta H$  und die Trennung verläuft nach dem SEC-Modus. Überwiegen die enthalpischen Wechselwirkungen, so erfolgt die Trennung nach dem LAC-Modus. Kompensieren sich die entropischen und die enthalpischen Wechselwirkungen, tritt der Grenzfall zwischen beiden Modi ein. Man spricht vom kritischen Punkt der Adsorption (liquid chromatography at critical conditions, LC-CC)<sup>15-25</sup>.

$$T\Delta S = \Delta H \quad (2.6)$$

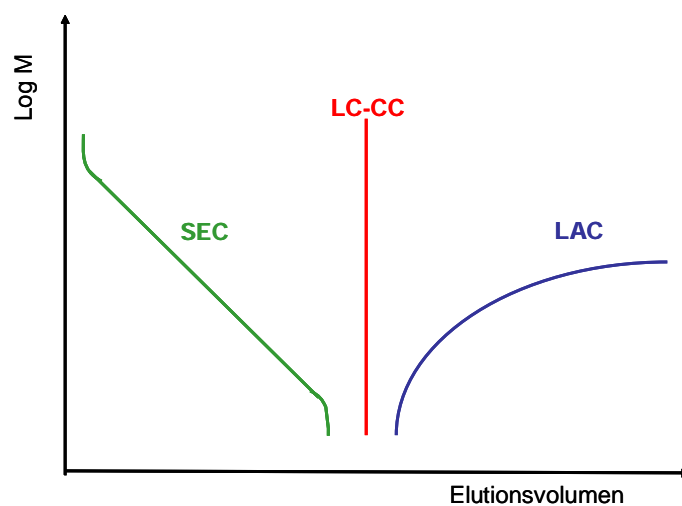
Aus Gl. 2.6 wiederum resultiert, dass  $\Delta G$  am kritischen Punkt der Adsorption Null ist und der Verteilungskoeffizient  $K_d = 1$  (Gl. 2.7).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = 0 \quad K_d = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = 1 \quad (2.7)$$

Unter diesen "kritischen" Bedingungen der Adsorption, die einen engen Bereich zwischen LAC- und SEC-Modus umfassen, verschwindet die Molmassenabhängigkeit von  $K_d$ , und die Elution wird nicht mehr von der



Kettenlänge sondern nur noch von den Inhomogenitäten des Makromoleküls (funktionelle Gruppen, Verzweigungen, Blöcke) bestimmt. Diese Bedingungen werden meist mit einem binären Eluenten aus einem thermodynamisch guten und schlechten Lösungsmittel durch Variation der Zusammensetzung eingestellt und gelten nur für ein einziges, chemisch einheitliches Polymer. Dieses wird beim kritischen Punkt chromatographisch "unsichtbar", d.h. es erscheint unabhängig von seiner Molmasse immer beim gleichen Elutionsvolumen (Abb. 2.1).



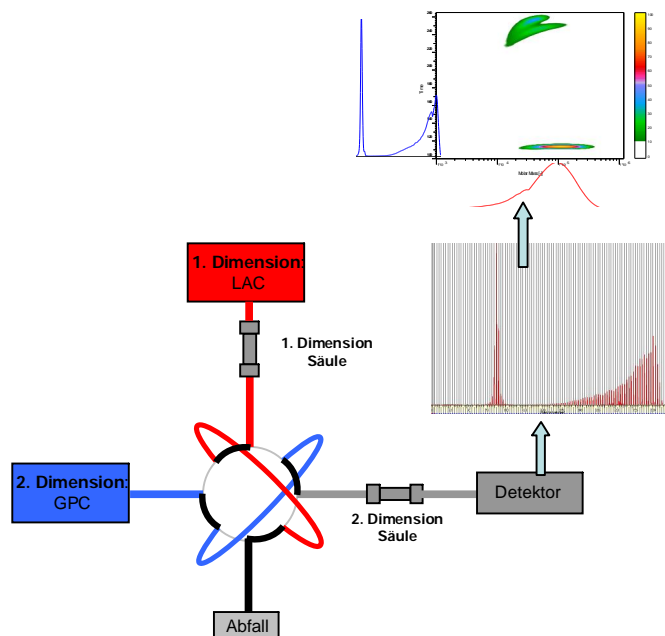
**Abb. 2.1** Molmassenabhängigkeit der Elutionsvolumina bei den verschiedenen Trennmodi (schematisch)

Als stationäre Phasen finden in der LC-CC meist Säulen aus der Adsorptionschromatographie Verwendung, da diese relativ inert gegenüber Änderungen in der Lösungsmittelzusammensetzung sind. Außerdem kann durch die Möglichkeit der Oberflächenmodifikation zu den verschiedenartigen Polaritäten eine Anpassung an die jeweilige Trennaufgabe erfolgen. Eine weitere wichtige Voraussetzung ist eine dem hydrodynamischen Volumen der Polymermoleküle angepasste Porengrößenverteilung der stationären Phase, die beim Variieren der Lösungsmittelzusammensetzung erhalten bleiben muss. Nur so kann überhaupt ein definierter kritischer Punkt eingestellt werden.

Lässt sich ein Trennproblem nicht bei einer konstanten Zusammensetzung der mobilen Phase, also bei isokratischen chromatographischen

Bedingungen lösen, so ist es möglich, Gradientenmethoden zu verwenden. Hierzu wird die Probe in einem guten Lösungsmittel gelöst. Diese Lösung wird in eine mobile Phase aus einem thermodynamisch schlechten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch injiziert. Bei der dabei erfolgenden Durchmischung und dem anschließenden Kontakt mit der stationären Phase können zwei Effekte auftreten. Zum einen kann das Polymer aufgrund der schlechteren Löslichkeit ausfallen, zum anderen kann es an der stationären Phase adsorbiert werden. Im Regelfall überlagern sich diese beiden Effekte und führen dazu, dass die Polymermoleküle am Anfang der stationären Phase ausfallen. Durch einen Lösungsmittelgradienten mit steigender Lösungsmittelgüte erfolgt ein Wiederauflösen der Polymermoleküle und es kommt unter Wechselwirkung mit der stationären Phase zu einer Elution der gelösten Moleküle in Abhängigkeit von der Molmasse, den Endgruppen und der chemischen Zusammensetzung. Die Güte der Trennung hängt von vielen Faktoren ab. Zu nennen sind hier insbesondere das Lösungsmittelsystem, d.h. die Kombination aus thermodynamisch gutem und schlechtem Lösungsmittel, die verwendete stationäre Phase, die Temperatur, der angewandte Gradient (Kurve, Fluss, Start- und Endbedingungen) und die Injektionsbedingungen (Volumen, Konzentration und Lösungsmittel). Seit Einführung der Gradienten-HPLC<sup>25,26</sup> wurde diese zum Trennen von Polymerblends<sup>27</sup>, statistischen und Blockcopolymeren verwendet. So wurden beispielsweise chromatographische Systeme zur Trennung von statistischen Copolymeren<sup>28-47</sup> aus Styrol mit Acrylnitril, Methylacrylat, Ethylacrylat und Ethylmethacrylat entwickelt. Blockcopolymere<sup>48-51</sup> aus Styrol mit Methylmethacrylat, Butylmethacrylat, Butadien und 2-Methoxyethylmethacrylat und Copolymere aus Methylmethacrylat und Methylacrylat konnten nach chemischer Zusammensetzung aufgetrennt werden. Die Gradientenchromatographie wurde auch eingesetzt, um die Pfpfreaktion von Methylmethacrylat auf EPDM zu untersuchen. Weiterhin wurde mittels Gradienten-HPLC wurde die Endgruppen-verteilung (functionality type distribution, FTD) von Polyestern<sup>52</sup> bestimmt.

Für eine umfassende Analyse von komplexen Polymeren müssen unterschiedliche Heterogenitätsparameter getrennt voneinander untersucht werden. Die Charakterisierung von Copolymeren erfolgt anhand ihrer chemischen Zusammensetzung und der Molmasse. Deshalb werden mindestens zwei verschiedene analytische Techniken für die Bestimmung dieser Parameter benötigt. Eine Möglichkeit, zwei molekulare Parameter gleichzeitig zu bestimmen, bietet die zweidimensionale (2D) Chromatographie. Bei der 2D-Chromatographie besteht das System aus zwei chromatographischen Apparaturen, die über ein Schaltventil on-line miteinander gekoppelt werden. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung in der Regel nach der chemischen Heterogenität via LC-CC oder Gradientenchromatographie. In der zweiten Dimension (SEC oder LAC) findet die Trennung anhand der Molmasse oder des Oligomerisierungsgrad statt. Die on-line Kopplung der Anlage erfolgt über ein 8-Port-Ventil mit zwei Speicherschleifen (Abb. 2.2). Fraktionen aus der ersten Dimension werden automatisch in die zweite Dimension transferiert. Das Ergebnis einer 2D-Chromatographie wird in Form eines Konturplots dargestellt. Auf der Abszisse ist die Molmasse und auf der Ordinate die chemische Heterogenität aufgetragen. Die relativen Anteile der Komponenten in der charakterisierten Substanz werden farbig kodiert wiedergegeben.



**Abb. 2.2** Aufbau einer 2D-Chromatographie und Konturplot

Voraussetzung für eine sinnvolle Kombination von zwei chromatographischen Trennmethode n ist die Selektivität der einzelnen Verfahren für jeweils nur einen Heterogenitätstyp. Dieses Prinzip der „Orthogonalen Chromatographie“ wurde von Balke et al. vorgeschlagen<sup>53</sup>. Eine kontinuierlich arbeitende on-line-Kopplung der LAC mit der SEC zur zweidimensionalen Chromatographie wurde von Kilz et al. entwickelt<sup>54-60</sup>. Eine Übersicht zur Bestimmung der MMD und der CCD von Polymeren mit chromatographischen Methoden gibt Trathnigg<sup>61</sup>. Die Verwendung gekoppelter Methoden zur Analyse von Polymeren mit komplexer Architektur zeigen Pasch et al.<sup>62,63</sup>. Einen Überblick über die 2D-Trennungen von komplexen Polymeren gibt Chang<sup>64</sup>.

## 2.2 Leistungsbewertung von chromatographischen Trennphasen

Bei der Flüssigchromatographie handelt es sich um ein physikalisches Verfahren, das die Verteilung von Stoffgemischen zwischen einer flüssigen mobilen und einer festen stationären Phase ausnutzt<sup>65</sup>. Die Trennung basiert auf unterschiedlichen Wechselwirkungen der Einzelkomponenten mit der stationären Phase, wodurch die Durchlaufzeit bzw. das Elutionsvolumen der Einzelstoffe variieren.

Die Trenneigenschaften der stationären Phase, die in eine chromatographische Säule gepackt wird, sind der Schlüssel bei der Auftrennung. Die Trennleistung wird durch die sogenannte van Deemter-Kurve<sup>66</sup> beschrieben, bei der das Höhenäquivalent eines theoretischen Trennbodens (HETP oder H) gegen die lineare Flussgeschwindigkeit (u) aufgetragen wird. Abb. 2.3 zeigt die schematische Darstellung einer van Deemter-Kurve.

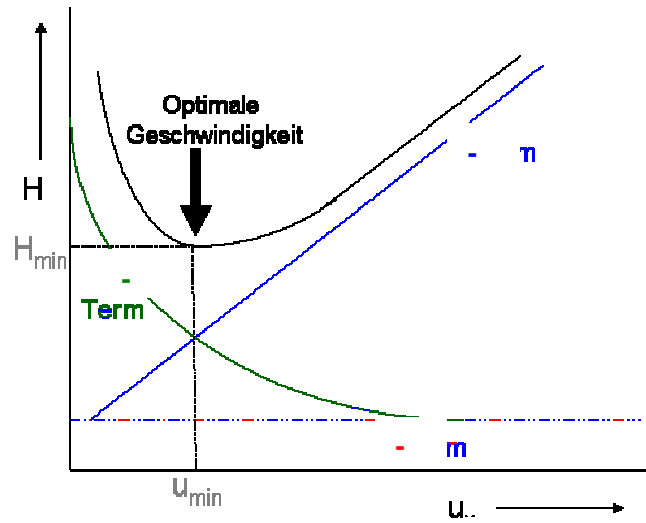


Abb. 2.3 Typische van Deemter-Kurve mit der optimalen Flussrate am Minimum von  $H$

Ein theoretischer Trennboden ist die gedachte Ebene innerhalb einer Säule, bei der sich ein Verteilungsgleichgewicht des Soluten zwischen mobiler und stationärer Phase einstellt. Das HETP ergibt sich als Quotient aus der Säulenlänge (aktive Zone) und der Anzahl der theoretischen Böden. Je kleiner das HETP ausfällt (führt zu mehr Gleichgewichtszuständen innerhalb der Säule), desto besser ist die Trennleistung (Auftrennung der Einzelkomponenten) der Säule. Die allgemeine Form der van Deemter-Gleichung wird in Gl. 2.8 angegeben.

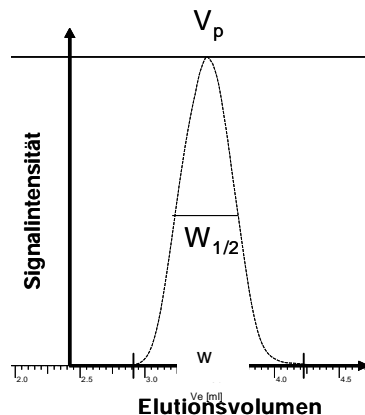
$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (2.8)$$

Dabei sind  $H$  die Bodenhöhe,  $u$  die lineare Fließgeschwindigkeit und  $A$ ,  $B$  und  $C$  Koeffizienten. Der A-Term oder die Eddy-Diffusion beschreibt die Substanzwanderung durch Poren und Kanäle unterschiedlicher Länge (Umwegeffekt). Dieser Faktor ist partikelgrößenabhängig und führt zur Verbreiterung der Elutionszone der gelösten Substanz.

Der B-Term beschreibt die longitudinale Diffusion. Da die Konzentration der Substanz im Zentrum der Elutionsbande größer ist als an den Flanken, diffundiert die Substanz von der Mitte zu den Kanten. Dies führt zu Peakverbreiterung. Bei höheren Flussraten hat die longitudinale Diffusion einen kleineren Einfluss, da die Substanz weniger Zeit in der Säule verbringt. Der C-Term beschreibt den Massentransfer: es dauert eine bestimmte Zeit, bis sich die Substanz im Gleichgewicht zwischen der mobilen und der

stationären Phase befindet. Bei hohen Durchflussgeschwindigkeiten kann sich dieses Gleichgewicht zwischen den Phasen nicht mehr einstellen. Der B-Term ist dominant bei niedrigen Flussgeschwindigkeiten während der C-Term bei höheren Flussgeschwindigkeiten bestimmend wird. Aus den van Deemter-Kurven kann man die Flussrate ( $u$ ) für eine interessierende Säule bestimmen, bei der die Trennleistung am höchsten ist. Sie wird dort von der Kurve abgelesen, wo HETP bzw.  $H$  am kleinsten ist ( $\frac{\Delta HETP}{\Delta u} = 0$ ). Bei schnellen Analysen arbeitet man meist bei Flussraten oberhalb der optimalen Geschwindigkeit. Wenn der C-Term minimiert wird ist es möglich, die Bandenverbreiterung zu minimieren.

Die Bodenzahl,  $N$ , ist ein weiterer Parameter zur Beschreibung der Trennleistung einer chromatographischen Säule. Die Bestimmung der theoretischen Bodenzahl pro Meter Säulenlänge,  $N_{th}$ , erfolgt nach der Methode der Halbwertsbreite (Abb. 2.4) gemäß Gl. 2.9.



**Abb. 2.4** Typisches Chromatogramm mit Halbwertsbreite.

$$N_{th} = \left(\frac{V_p}{\sigma}\right)^2 = 554 \frac{V_p}{L} \left(\frac{V_p}{\sigma}\right)^2 \quad [m^{-1}] \quad (2.9)$$

Dabei ist  $V_p$  das Elutionsvolumen des Peakmaximums,  $\sigma$  die Varianz, die aus der Halbwertsbreite ( $w_{1/2}$ ) abgeschätzt werden kann und  $L$  die Säulenlänge in cm. Aus der experimentell bestimmten Bodenzahl  $N$  wird die Bodenhöhe  $H$  berechnet (Gl. 2.10).

$$H = 1/N \quad (2.10)$$

Die lineare Flussgeschwindigkeit  $u$  wird in mm/s angegeben und berechnet sich aus der so genannten "Totzeit" ( $t_0$ , Elutionszeit beim Durchlaufen des Volumens der gesamten mobilen Phase) und der Säulenlänge  $L$  (Gl. 2.11).

$$u = L/t_0 \quad (2.11)$$

Eine weitere wichtige Kenngröße für die Beschreibung von chromatographischen Säulen ist die Auflösung ( $R_s$ ). Sie gibt an, wie gut zwei chromatographische Peaks voneinander getrennt sind. Zur Bestimmung wird eine Mischung von Polymerstandards injiziert und die Auflösung nach Gl. 2.12 berechnet.

$$R_s = (v_2 - v_1) / 2 (\sigma_1 + \sigma_2) = \lg (M_1 / M_2) / 2 D (\sigma_1 + \sigma_2) \quad (2.12)$$

mit  $v_1$  und  $v_2$  als Elutionsvolumina von Peak 1 und 2,  $\sigma_1$  und  $\sigma_2$  der Varianz,  $M$  der Molmasse und  $D$  der Steigung der Kalibrierkurve.

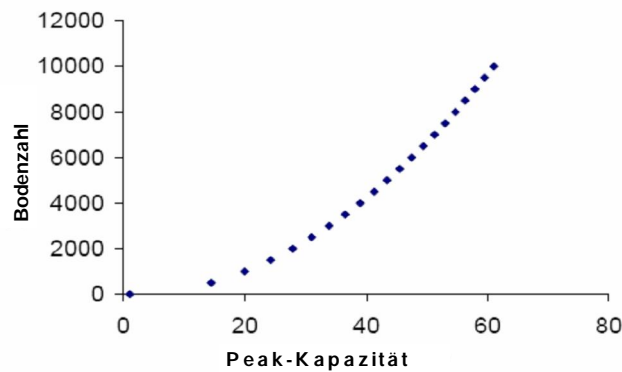
### 2.3 Schnelle Flüssigchromatographie von Polymeren

Der Begriff "Schnelle Chromatographie" ist relativ. Die reine Analysenzeit selbst ist ein unzureichendes Maß für die chromatographische Leistung. Wichtiger ist die Anzahl der getrennten Peaks pro Zeiteinheit. So ist zum Beispiel die Trennung von 10 Komponenten in 10 min effektiver als die Trennung von 2 Komponenten in der gleichen Zeit. Die Begriffe "schnelle" und "ultraschnelle Chromatographie" werden alltäglich in der Literatur benutzt ohne jedoch genau definiert zu sein.

Für die Bewertung der Qualität einer bestimmten Trennung in einem gegebenen Zeitraum kann die Peak-Kapazität genutzt werden. Diese beschreibt die Anzahl Peaks die zwischen  $t_0$  und dem "letzten Peak" voneinander getrennt werden können. Giddings<sup>67</sup> beschreibt die Peak-Kapazität,  $n$ , für ein flüssigchromatographisches System mit Gl. 2.13 über die Bodenzahl,  $N$ .

$$n \cong 1 + 0,6 \sqrt{N} \quad (2.13)$$

Hierbei ist  $n$  jedoch lediglich ein theoretischer Wert, der in praktischen Anwendungen nicht erreicht wird<sup>68</sup> (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5** Theoretische Böden als Funktion der Peak-Kapazität berechnet nach Gl. 2.13

Erfahrungsgemäß kann die Peak-Kapazität verbessert werden, wenn ein Gradient verwendet wird. Für die Gradientenchromatographie erweiterten Neue et al.<sup>69</sup> das Peak-Kapazität-Modell von Giddings durch die von Snyder entwickelte "linear solvent strength" Theorie (LSS-Theorie)<sup>70,71</sup>. Gl. 2.14 zeigt Neue's Beziehung zur Berechnung der Peak-Kapazität,  $P$ .

$$P = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{B\Delta c}{B\Delta c(t_0/t_g) + 1} \quad (2.14)$$

Hierbei ist  $t_g$  die Gradientenzeit,  $B$  ein Gradientenparameter, berechnet aus der Steigung der Beziehung zwischen  $\ln(k)$  und der Lösungsmittelzusammensetzung und  $\Delta c$  die Änderung in der Zusammensetzung des Eluenten über den Gradienten. Dabei wird angenommen, dass die Beziehung zwischen  $\ln(k)$  und der Lösungsmittelzusammensetzung linear ist (linearer Gradient).

Neue hat diese Gleichung genutzt, um den Effekt der Gradientendauer auf die Säulenleistung zu zeigen<sup>68</sup>. So liegt für isokratische Messungen die optimale Flussgeschwindigkeit stets am Minimum der van Deemter-Kurve



(Abb. 2.3). Dies trifft bereits in der Gradientenchromatographie für sehr lange Gradienten nicht mehr zu. Bei hohen linearen Flussgeschwindigkeiten ergeben sich neue optimale Flussgeschwindigkeiten, deren Lage eine Funktion der Gradientendauer ist. Für sehr lange Gradienten nähert sich die optimale lineare Flussgeschwindigkeit derjenigen der isokratischen Messung. Für sehr schnelle Gradienten bei vorgegebener Gradientendauer ergeben hohe lineare Flussgeschwindigkeiten bessere Trennungen. Ziel der Arbeit ist es Möglichkeiten aufzuzeigen, leistungsfähige Trennungen bei hohen Flussraten ohne hohe Gegendrücke durchzuführen.

## 2.4 Einflussfaktoren der schnellen Chromatographie

Prinzipiell können Analysenzeiten in der Chromatographie durch höhere Flussraten, Verkürzung der Säulen, Verringerung des Partikeldurchmessers der stationären Phase und Erhöhung der Säulentemperatur verringert werden. Jeder dieser Parameter ist verknüpft mit den Größen Analysenzeit, Säulengegendruck und Trennleistung. Tab.1 zeigt die Beziehung zwischen diesen Parametern.

**Tab. 1** Beziehungen zwischen den wählbaren Parametern Säulenlänge, Flussrate, Partikelgröße und Säulentemperatur und den damit verknüpften Größen Analysenzeit, Säulengegendruck und Säulenleistung<sup>72</sup>

	Säulenlänge (L)	Flussrate (F <sub>c</sub> )	Partikelgröße (d <sub>p</sub> )	T <sub>Säule</sub> (T)
Analysenzeit	$\propto L$	$\propto 1/F_c$	nicht gekoppelt	$\propto 1/T^x$
Säulengegendruck	$\propto L$	$\propto F_c$	$\propto 1/(d_p)^2$	$\propto 1/T$
Trennleistung (N)	$\propto L$	van Deemter	$\propto 1/d_p$	$\propto T$

Die einfachste Art, schnellere Analysen durchzuführen, besteht in der Erhöhung der Flussrate. Die Analysenzeit ist umgekehrt proportional zur Flussrate und eine Verdopplung der Flussrate führt zu einer Halbierung der Analysenzeit. Gleichzeitig ist der Säulengegendruck proportional zur Flussrate. Die meisten schnellen chromatographischen Messungen werden oberhalb der durch das van Deemter-Minimum gegebenen optimalen Flussgeschwindigkeit betrieben, typischerweise bei der schnellstmöglichen

Flussrate innerhalb der Säulen- und Systemparameter. Die Retentionszeit der Analyten und die Trennleistung sind direkt proportional zur Säulenlänge. Eine Verkürzung der Säule ist noch annehmbar, so lange die Säulenleistung ausreichend für die Analyse ist. Der Säulengegendruck ist proportional zur Säulenlänge. Zur schnellen Chromatographie kann eine kürzere Säule (verringert die Analysenzeit) mit kleineren Partikeln (verbessert die Auflösung) kombiniert werden. Kurze Säulen mit kleinen Partikeln bei der höchstmöglichen Flussrate ist der gängigste Weg, schnelle Trennungen zu erreichen.

Der Massentransfer ist der dominierende Einflussfaktor auf die Säulenleistung bei höherer Flussrate wie aus Abb. 2.3 hervorgeht. Eine Verkleinerung des Partikeldurchmessers hat eine günstige Auswirkung auf die Trennleistung bei höherer Flussrate, da kleinere Partikel den Massentransfer begünstigen. Nachteilig bei der Verkleinerung des Partikeldurchmessers ist jedoch eine Erhöhung des Säulengegendrucks bei hohen Flussraten, da der Säulengegendruck quadratisch mit der Partikelgröße verknüpft ist. Eine Erhöhung der Säulentemperatur hat den Vorteil, dass die Viskosität der Lösungsmittel damit auch der Säulengegendruck sinkt. Dies lässt höhere Flussraten zu. Die thermische Stabilität des Analyten und der stationären Phase sowie der Siedepunkt der mobilen Phase begrenzen die Anwendung höherer Säulentemperaturen. Auch bei erhöhter Säulentemperatur bleibt der Säulengegendruck ein einschränkender Faktor.

## **2.5 Monolithische stationäre Phasen**

Langsamer Massentransfer und hoher Säulengegendruck sind zwei generelle Nachteile aller partikelbasierten stationären Phasen. Die mobile Phase in einer partikulären Säule muss durch die Poren innerhalb der Partikel und die Zwischenräume zwischen den Partikeln fließen. Knox und Bristow erkannten die potentiellen Vorteile monolithischer stationärer Phasen schon vor 30 Jahren<sup>73</sup>. Sie schlugen die Präparation eines formstabilen Schaums in der Säule vor. Kommunizierende Poren würden ein Netzwerk

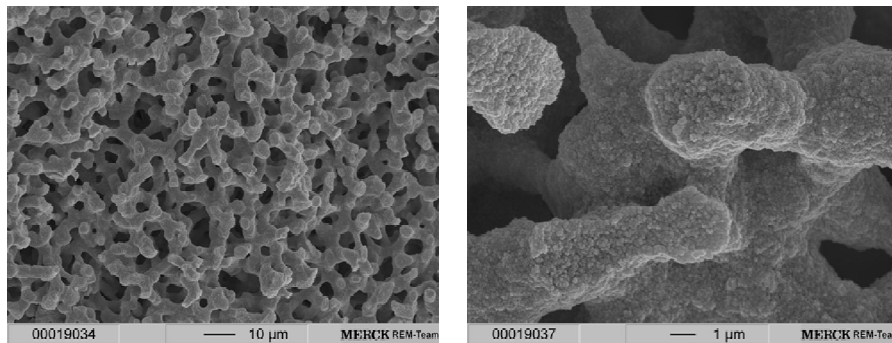
darstellen, durch welches die mobile Phase fließen kann. Die Motivation ergibt sich aus der Erkenntnis, dass monolithische Materialien mit großen Durchporen oder Kanälen höhere Permeabilitäten besitzen sollten. Gleichzeitig kann die nötige Oberfläche für Adsorptionsvorgänge durch Mesoporen im monolithischen Skelett geschaffen werden.

Monolithische stationäre Phasen können aus organischen Polymeren oder Kieselgel aufgebaut sein. Die ersten monolithischen Säulen basierten auf organischen Polymeren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben über die Präparation und Anwendung von monolithischen Phasen aus Polyurethan<sup>74</sup>, Polyacrylamid<sup>75</sup>, Polyacrylaten oder Styrol/Divinylbenzol-Copolymeren<sup>76</sup> berichtet. Sie werden in der Gaschromatographie, der HPLC und der Kapillarelektrochromatographie (CEC) eingesetzt. Auf organischen Polymeren basierende monolithische Phasen zeigen in der HPLC die Nachteile, die typisch sind für alle polymeren stationären Phasen. Dazu gehört, dass die meisten organischen Polymere, insbesondere solche mit niedriger Vernetzung, in organischen Lösungsmitteln quellen oder schrumpfen. Diese Eigenschaft kann die chromatographische Leistung von monolithischen Säulen beeinflussen und zu mangelhafter mechanischer Stabilität führen. Polymermonolithische Säulen sind in geeigneten Kartuschen kommerziell verfügbar.

Die Nachteile der organischen Materialien entfallen bei porösen anorganischen Monolithen. 1979 berichten Pretorius et al.<sup>77</sup> über zwei Methoden zur Herstellung offenporiger Kieselgelschäume, die für die in-situ Zubereitung von neuen Trägermaterialien geeignet sind. Später entwickelten Nakanishi et al.<sup>78</sup> ein neues Sol-Gel-Verfahren zur Herstellung monolithischer Säulen mit bimodaler Porenstruktur bestehend aus Durch- oder Makroporen und Mesoporen. Ihre Methode beruht auf der Hydrolyse und Polykondensation von Alkoxysilan in Gegenwart wasserlöslicher Polymere. Tanaka et al.<sup>79</sup> und Cabrera et al.<sup>80</sup> bewiesen, dass diese Methode zur Herstellung chromatographischer Säulen geeignet ist, die sich durch hohe Trennleistung und niedrigen Säulengegendruck auszeichnen. Die Verbesserungen beruhen auf der unabhängigen Kontrolle der Größe des

Kieselgelskeletts (Makroporen) und der Mesoporen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Säulen bei hohen Flussraten eine hohe Effizienz besitzen. Schulte et al.<sup>81</sup> berichten über die Anwendung von derartigen Kieselgelmonolithen (25 mm  $d_p$ ) in der präparativen Chromatographie. Tanaka et al.<sup>82</sup> berichten über die Synthese monolithischer Materialien innerhalb zugeschmolzener Kieselgelkapillaren zur Anwendung in LC- und CEC-Trennungen. Hier besteht der Vorteil, dass keine zusätzliche Umhüllung nötig ist. Die Leistungsfähigkeit dieser Mikrosäulen für praktische Anwendungen ist bewiesen, jedoch müssen die Trennleistung und die Langzeitstabilität verbessert werden.

Monolithische stationäre Phasen sind kommerziell erhältlich. Sie werden durch die Nakanishi-Methode mittels Sol-Gel-Prozess<sup>78,79,82-86</sup> hergestellt. Hierbei entstehen sowohl Makro- als auch Mesoporen (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6** SEM-Bild des Ausschnitts eines Kieselgelstabs, poröse Struktur mit Kanälen (links, 2 µm) und Mesoporen (rechts, 13 nm)<sup>80</sup>.

Nach der Herstellung wird der Monolith durch Wärmeschrumpfung mit PEEK ummantelt. Durch diese Methode werden Wandeffekte vermieden. Abb. 2.7 zeigt den Unterschied zwischen partikulärem Kieselgel und einem monolithischen Kieselgelstab.



**Abb. 2.7** Monolithischer Kieselgelstab vs. partikuläres Kieselgel (links), rechts Kieselgelstab, PEEK Ummantelung und die fertige Säule<sup>80</sup>.

Eine Oberflächenmodifizierung kann wie bei den herkömmlich gepackten Säulen durchgeführt werden.

Monolithische Kieselgel-basierte stationäre Phasen wurden seit ihrer Einführung für die Trennung von Pharmazeutika und Metaboliten, Lebensmitteladditiven und Enantiomeren verwendet, wie Cabrera in einem Übersichtsartikel<sup>87</sup> beschreibt. Die Trennung synthetischer Polymere auf monolithischen Phasen wird erstmals durch Svec et al.<sup>6-9</sup> beschrieben. Die Autoren verwendeten eine monolithische Säule aus Poly(Styrol-co-Divinylbenzol) mit einer Dimension von 50 x 8 mm I.D. und trennten u.a. Styrololigomere in einem THF/Wasser-Gradienten. Als weitere Beispiele trennten sie Polystyrol, Polymethacrylate, Polyvinylacetat und Polybutadien durch Adsorption am Monolithen (Fällung) und anschließende Gradientenchromatographie nach der Molmasse. Dazu wurde das System mit engverteilten Standards geeicht und der Einfluss der Flussrate, der injizierten Menge und der Gradientenform untersucht.

### **3 Entwicklung von Methoden für die schnelle Größenausschlusschromatographie (SEC)**

Die SEC ist typischerweise eine relativ langsame chromatographische Methode. Der hohe Zeitbedarf der SEC ergibt sich aus den langsamen Diffusionsprozessen der Makromoleküle innerhalb der stationären Phase. Eine Beschleunigung von SEC-Messungen kann prinzipiell durch eine Verringerung des Säulenvolumens oder eine Erhöhung der Flussrate erreicht werden. Eine Reduzierung der Säulenlänge führt zwar zu erhöhtem Durchsatz, jedoch gleichzeitig zu einer Verringerung des Porenvolumens und damit zu geringerer Trennleistung<sup>14,88-90</sup>. Diesem Problem kann durch die Entwicklung neuer stationärer Phasen entgegengewirkt werden. Durch eine Erhöhung der Flussrate bei gegebener Säule ändert sich hingegen das van Deemter-Verhalten und der Säulengegendruck steigt. Man kann jedoch bei konstantem Säulenvolumen die Flussrate erhöhen und gleichzeitig die lineare Flussgeschwindigkeit konstant halten, wenn man das Aspektverhältnis (Verhältnis von Länge zu Innendurchmesser) ändert (Umdimensionierung). Dazu ist es notwendig, den Säulenquerschnitt im Verhältnis der Flussraten anzupassen. Dadurch ergeben sich kurze, dicke Säulen (50 x 20 mm I.D.). Zusätzlich zur Zeitersparnis ergibt sich eine Verringerung des Gegendrucks.

#### **3.1 Schnelle SEC in Tetrahydrofuran (THF)**

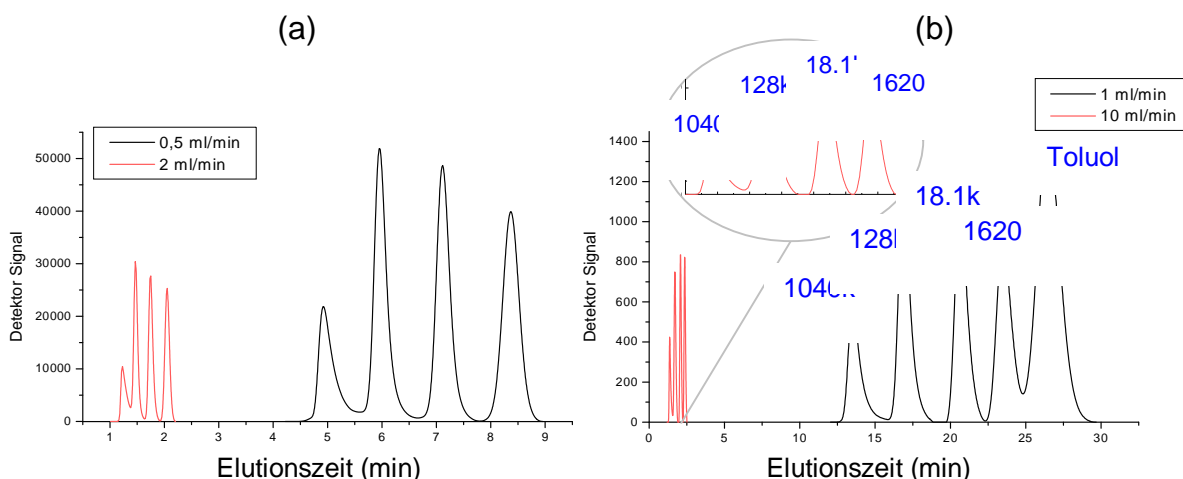
Das am weitesten verbreitete Packungsmaterial für den Einsatz in der SEC basiert auf Styrol-Divinylbenzol-Copolymeren. Als mobile Phase wird häufig Tetrahydrofuran eingesetzt. Neben Säulen mit konventionellen Dimensionen werden seit einiger Zeit sowohl kürzere und dickere<sup>88</sup> als auch in der Länge reduzierte Säulen angeboten. Abb. 3.1 zeigt den Vergleich einer konventionellen SEC-Säule mit einer „High Speed“-Säule der Fa. Polymer Standards Service und einer „Rapide“-Säule der Fa. Polymer Laboratories.



**Abb. 3.1** Größenvergleich einer konventionellen SEC-Säule (oben), einer PL „Rapide“-Säule (Mitte) und einer PSS „High Speed“-Säule (unten)

Während die konventionelle Säule eine Länge von 300 mm bei einem Säulennendurchmesser (I.D.) von 8 mm aufweist, betragen die Dimensionen der „High Speed“-Säule 50 mm Länge und 20 mm Innendurchmesser, die der „Rapide“-Säule 150 mm Länge und 7,5 mm Innendurchmesser. Im ersten Fall wird im Vergleich zu den konventionellen Säulen das Porenvolumen beibehalten, während im zweiten Fall das Porenvolumen um den Faktor 2 reduziert wird.

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Eignung dieser Säulen für schnelle Trennungen und ihre Leistungsgrenzen zu untersuchen. Dazu sollte der Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung, die Kalibration und die Genauigkeit der Molmassenbestimmung für die „Rapide“- und „High Speed“-Säule beurteilt werden. Abb. 3.2 zeigt die Auftrennung von Polystyrol-Kalibrationsstandards bei Flussraten von 0,5 und 2 ml/min für eine „Rapide“-Säule und 1 bzw. 10 ml/min für eine Kombination von zwei „High Speed“-Säulen.



**Abb. 3.2** Chromatogramme von Mischungen aus Polystyrolstandards unterschiedlicher Molmasse, stationäre Phase: (a) PL mixed L, „Rapide“, (b) SDV  $10^4 \text{ \AA} + 10^5 \text{ \AA}$ , „High Speed“, Säulendimensionen: (a) 150 x 7,5 mm I.D., (b) 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: THF, Kalibrationsstandards: PS 1040k, 128k, 18.1k, 1620 g/mol

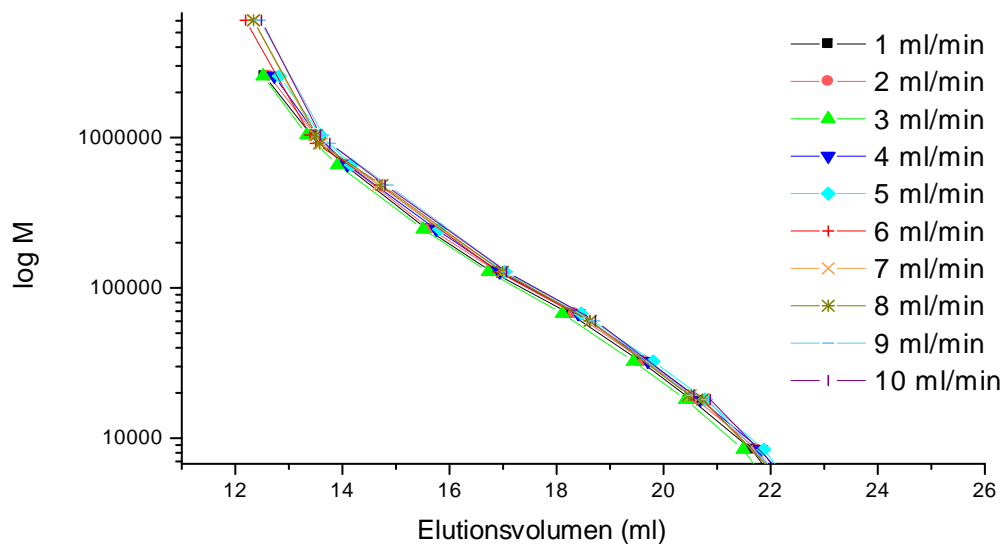
Für jede Partikelgröße der stationären Phase existiert eine optimale lineare Flussgeschwindigkeit, bei der eine maximale Trennleistung erzielt wird. Bei Partikeln mit Größen von 5-10  $\mu\text{m}$ , wie sie für gängige SEC-Gele verwendet werden, liegt diese optimale Flussgeschwindigkeit bei etwa 1-2 cm/min, was bei Säulendimensionen von 300 x 8 mm I.D. einer Flussrate von 1-2 ml/min entspricht. Abb. 3.2 (a) zeigt die Trennung auf einer Säule, deren Porenvolumen gegenüber der konventionellen Säule verringert ist. Zwar führt die Flussratenerhöhung auf 2 ml/min zu einer Verringerung der Gesamtanalysenzeit auf 2,5 min, jedoch ist dies mit einem Verlust an Trennleistung verbunden.

Eine Verringerung des Porenvolumens führt zu einem Verlust an Auflösung. Schnelle Analysen ohne einen Verlust an Auflösung können demnach nur durchgeführt werden, wenn das Porenvolumen beibehalten wird. Die Bedingung gleichen Porenvolumens lässt sich jedoch nur erfüllen, wenn die Säulendimensionen geändert werden. Eine Veränderung des Säulenquerschnittes bei konstanter Flussrate resultiert in einer Veränderung der linearen Flussgeschwindigkeit und damit in einer anderen Position auf der van Deemter-Kurve. Dies wiederum führt zu einer Änderung der Trennbodenzahl. Um die Trennbodenzahl bei verändertem Aspektverhältnis konstant zu halten, muss die lineare Flussgeschwindigkeit erhalten bleiben. Dies wird erreicht, indem man die Flussrate im Verhältnis der Säulenquerschnitte ändert. Bei „High Speed“-Säulen entspricht dies einer Erhöhung der Flussrate um den Faktor 6,25 im Vergleich zu einer konventionellen Säule und führt zu einer Verkürzung der Analysenzeit um denselben Faktor. Ein zusätzlicher positiver Nebeneffekt ist, dass die Verringerung der Säulenlänge mit einer erheblichen Verringerung des Säulengegendruckes einhergeht. Bei konventionellen Säulen liegt dieser bei einer Flussrate von 1 ml/min bei ca. 20-25 bar. Dadurch lassen sich diese Säulen nur bis maximal ca. 4 ml/min verwenden. Bei der „High Speed“-Säule ergeben sich selbst bei hohen Flussraten (9 ml/min) sehr niedrige Gegendrucke, wodurch die Säulen auch bei noch höheren Flussraten betrieben werden können. Dies kann zu einer weiteren Verkürzung der Analysenzeiten genutzt werden. Abb. 3.2 (b) zeigt deutlich, dass selbst bei



Flussraten von 10 ml/min eine Basislinientrennung der PS-Standards erreicht wird. Man kann erkennen, dass die Auflösung der erhaltenen Peaks sehr gut ist und die Analysenzeit um den Faktor 10 verringert wurde. Die Trennung bei 10 ml/min wurde mit einer Kombination von zwei Säulen mit unterschiedlichen Porengrößen innerhalb von 2,5 min erreicht.

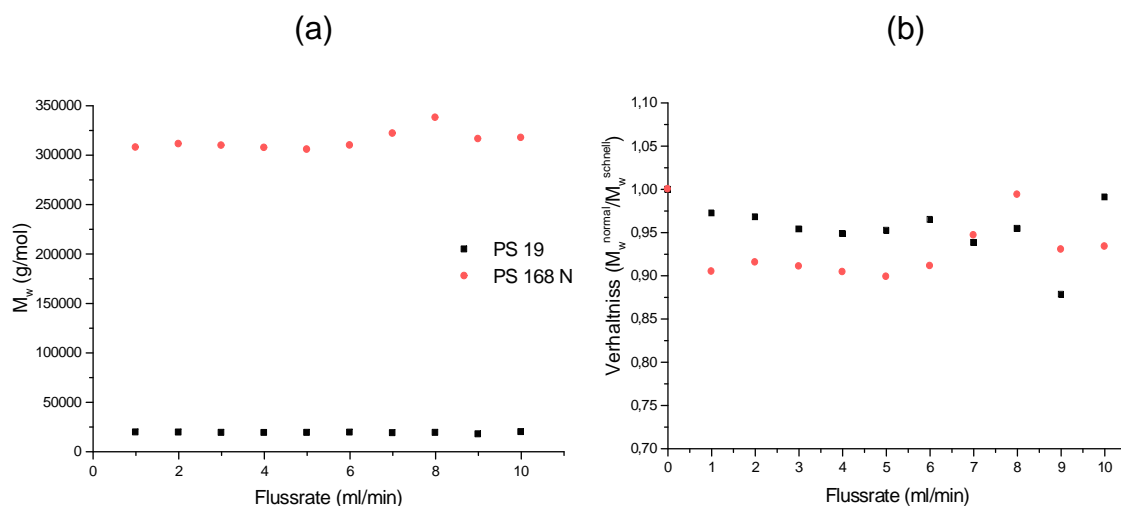
Im Folgenden soll nun überprüft werden, ob eine Erhöhung der Flussrate einen Einfluss auf die entsprechenden Kalibrationskurven hat. Aus den Kalibrationskurven kann die spezifische Auflösung bestimmt werden. Diese gibt an wie gut die Trennung zweier Peaks ist, deren Molmassen sich um eine Dekade voneinander unterscheiden. Dazu wurden die Kalibrationskurven für Polystyrolstandards auf „High Speed“-Säulen bei verschiedenen Flussraten aufgenommen (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3** Überlagerung der Kalibrationskurven von Polystyrolstandards auf „High Speed“-Säulen bei verschiedenen Flussraten, stationäre Phase: SDV  $10^4 \text{ \AA} + 10^5 \text{ \AA}$ , 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: THF

Man kann erkennen, dass die Flussrate keinen signifikanten Einfluss auf die Steigung der Kalibrationskurven sowie die spezifische Auflösung und Trennleistung hat. Die Analysenzeiten werden jedoch um den Faktor 10 reduziert, wenn man die Flussrate von 1 auf 10 ml/min erhöht.

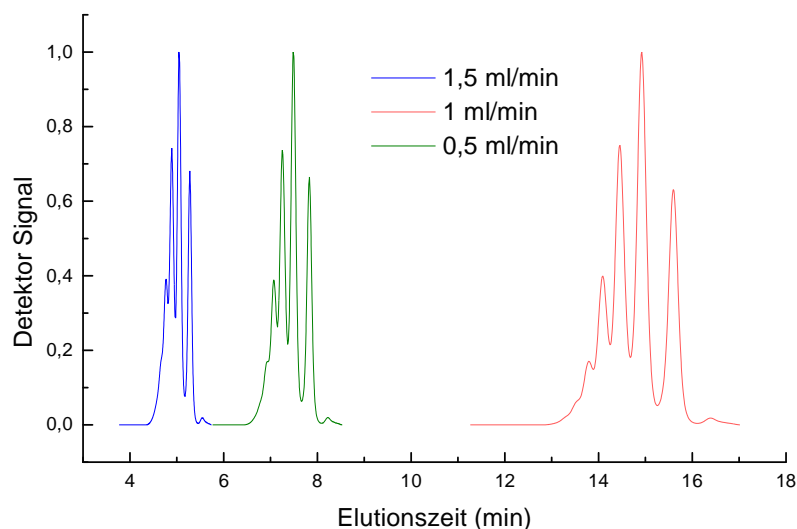
Um den Einfluss der Flussrate auf die Bestimmung von  $M_w$  zu untersuchen, wurden Molmassenbestimmungen von zwei breitverteilten PS-Proben bei verschiedenen Flussraten durchgeführt. Die erhaltenen gewichtsmittleren Molmassen sind in Abb. 3.4 (a) als Funktion der Flussrate dargestellt. Auch hier zeigt sich deutlich, dass für beide Proben nahezu konstante Werte in einem Bereich von 1-10 ml/min erhalten werden. Um die Abweichung zur konventionellen Messung (Flussrate 1 ml/min, gemessen auf SDV  $10^3 \text{ \AA}$ ,  $10^5 \text{ \AA}$  und  $10^6 \text{ \AA}$ , 300 x 8 mm I.D.) besser beurteilen zu können, sind in Abb. 3.4 (b) die auf der „High Speed“ Säule erhaltenen  $M_w$  relativ zu den auf der konventionellen Säule gemessenen Werten dargestellt. Der Messpunkt bei einer Flussrate von 0 ml/min entspricht der Messung auf den konventionellen Säulen. Die mittleren Molmassen, die bei diesen Flussraten auf der „High Speed“-Säule erhalten werden, liegen geringfügig unter den auf konventionellen Säulen bestimmten Werten. Sie sind jedoch für Screening-Experimente, wie sie im Bereich der kombinatorischen Materialforschung betrieben werden, in ihrer Genauigkeit ausreichend. Sowohl für die hoch- als auch für die niedermolekulare Probe liegen die Fehler im Bereich von 10 %. Dabei tritt eine systematische Abweichung zu kleineren  $M_w$  auf.



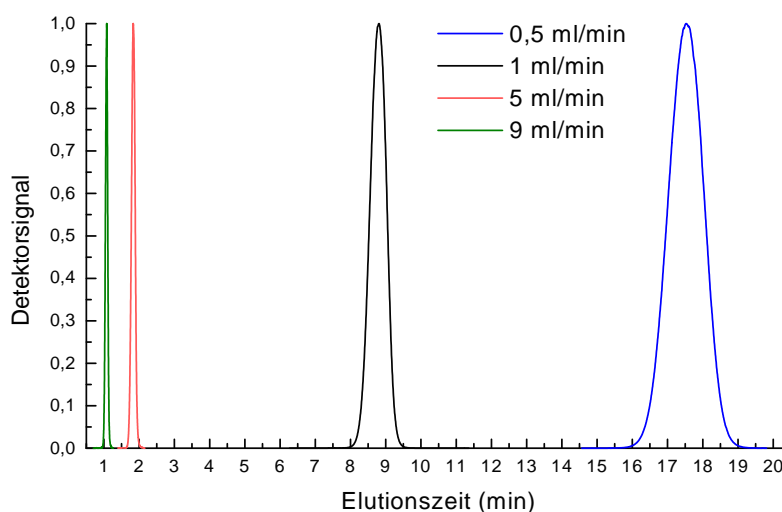
**Abb. 3.4** Gewichtsmitte Molmasse als Funktion der Flussrate (a), Abweichung der Molmasse im Vergleich zu konventionellen Säulen (b), stationäre Phase: SDV  $10^4 \text{ \AA} + 10^5 \text{ \AA}$ , 50 x 20 mm I.D. mobile Phase: THF

Die Trennung im Oligomerbereich sollte nun ebenfalls unter konventionellen und schnellen Bedingungen getestet werden. Als Beispiel einer Oligomertrennung wurde die Auftrennung eines Oligostyrols mit einer Molmasse von

374 g/mol auf einer konventionellen und einer „High Speed“-Säule untersucht (Abb. 3.5a und b).



**Abb. 3.5a** Oligomertrennung auf einer konventionellen Säule bei unterschiedlichen Flussraten, stationäre Phase: SDV 100 Å, 300 x 8 mm I.D., mobile Phase: THF, Probe: Polystyrol 374 g/mol



**Abb. 3.5b** Oligomertrennung auf einer „High Speed“-Säule bei unterschiedlichen Flussraten, stationäre Phase: SDV 100 Å, 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: THF, Probe: Polystyrol 374 g/mol

Anders als im Bereich hoher Molmassen ist die Trennleistung der „High Speed“-Säulen im Oligomerbereich deutlich schlechter als bei konventionellen Säulen. Bei der vorliegenden Oligomerprobe beobachtet man eine massive Verringerung der Auflösung beim Übergang von der konventionellen auf die schnelle Säule (Abb. 3.5b). Während die konventionelle Säule gut getrennte Signale für die einzelnen Oligomere liefert, erhält man bei der „High Speed“-Säule lediglich einen breiten Peak mit

der Andeutung einer Schulter im niedermolekularen Bereich. Eine Verbesserung der Auflösung wird auch nicht durch Flussratenänderungen erreicht. Die Retentionszeiten sind aufgrund identischer Säulenvolumina ähnlich. Gleiches gilt auch für die Trennstufenhöhe oder die dazu umgekehrt proportionale Trennbodenzahl.

Die Beziehung zwischen der Trennbodenzahl pro Meter Säulenlänge,  $N_{th}$ , und der Halbwertsbreite des chromatographischen Peaks,  $W_{1/2}$ , ist gegeben durch

$$N_{th} = 554 / L \left( \frac{V_p}{W_{1/2}} \right)^2 [m^{-1}] \quad (3.1)$$

Hierbei ist  $V_p$  das Elutionsvolumen und  $L$  die Säulenlänge. Bei vergleichenden Untersuchungen zum chromatographischen Verhalten stellt man fest, dass die Werte für  $N_{th}$  beim Übergang von der konventionellen auf die schnelle Säule abnehmen (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1** Vergleich der Bodenzahl (gemessen an Toluol) von konventioneller und schneller Säule

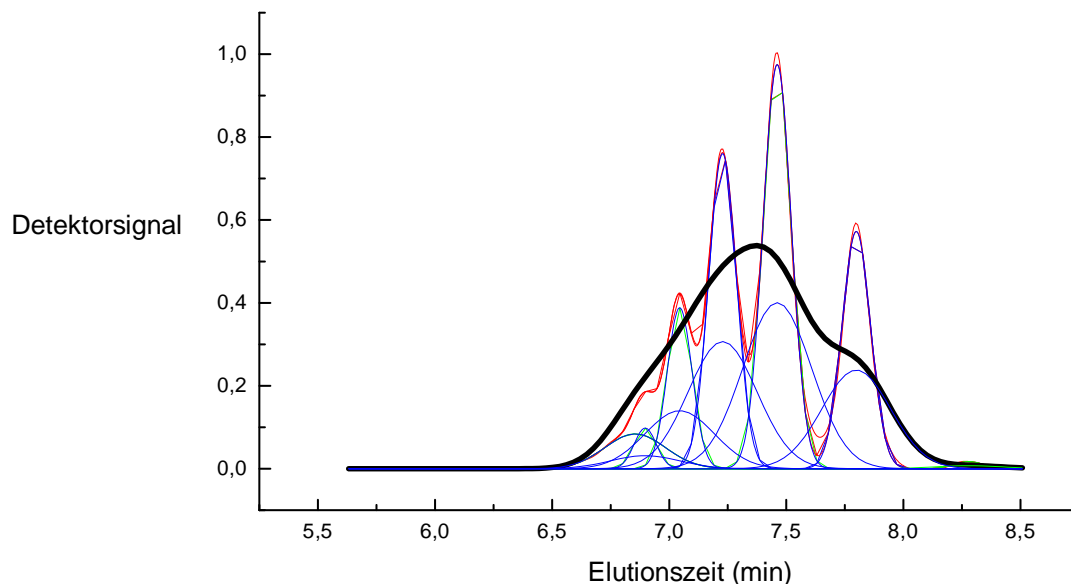
Säule	Fluss (ml/min)	Bodenzahl ( $m^{-1}$ )
SDV 100 Å, 300x 8 mm	0,5	55300
	1,0	75500
	1,5	77900
SDV 100 Å, 50 x 20 mm I.D.	0,5	2500
	1,0	23000
	2,0	35000
	3,0	39400
	4,0	43900
	5,0	44300
	6,0	44100
	7,0	41600
	8,0	42000
	9,0	40300

Aufgrund des gleichen Säulenvolumens sind die Elutionsvolumina,  $V_p$ , nahezu identisch. Nach Gleichung 3.1 ergibt sich für die Halbwertsbreite:

$$N_{th} = \frac{554}{L_1[m]} \left( \frac{V_P}{W_{1/2,1}} \right)^2 \quad [m^{-1}] = \frac{554}{L_2[m]} \left( \frac{V_P}{W_{1/2,2}} \right)^2 \quad [m^{-1}] \quad (3.2)$$

$$\Rightarrow W_{1/2,2} = W_{1/2,1} \cdot \sqrt{\frac{L_1}{L_2}}$$

Somit sollte die Verringerung der Säulenlänge um den Faktor 6 bei konstantem Säulenvolumen in einer um den Faktor  $\sqrt{6}$  vergrößerten Halbwertsbreite resultieren und einen Verlust an Auflösung zur Folge haben. Um zu überprüfen, ob dies die deutlich schlechter aufgelösten Chromatogramme erklärt, wurde das Chromatogramm, welches auf der konventionellen Säule erhalten wurde, auf die Bedingungen einer schnellen Säule umgerechnet. Hierzu wurde das Ausgangschromatogramm in Gauss-Peaks mit gleicher Halbwertsbreite zerlegt. Die Halbwertsbreiten wurden anschließend um den Faktor  $\sqrt{6}$  vergrößert und die daraus resultierenden Signale der Peaks addiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.6 gezeigt.



**Abb. 3.6** Theoretische Berechnung der Bandenverbreiterung von gut aufgelösten Peaks (rote Kurve) aus der Messung auf der 300 x 8 mm I.D. Säule (blaue Kurve) und vorhergesagter Peak (schwarz) auf der 50 x 20 mm I.D. Säule, mobile Phase: THF, Probe: Polystyrol 374 g/mol

Durch Vergleich von Abb. 3.5b und 3.6 kann man eine gute Übereinstimmung der berechneten mit der gemessenen Peakform erkennen. Die Verkürzung der Analysenzeit durch eine Verringerung der Säulenlänge bei gleichzeitiger Erhöhung des Säulenquerschnittes ist also prinzipiell mit

einem erheblichen Auflösungsverlust verbunden. Bei hochmolekularen Proben fällt dies nicht ins Gewicht, da die einzelnen Polymerisationsgrade ohnehin nicht mehr aufgetrennt werden können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für hochmolekulare Proben durch den Einsatz von „High Speed“-Säulen eine erhebliche Verringerung der Analysenzeiten bei vergleichbaren Auflösungen im Vergleich zu konventionellen Säulen erreicht werden kann. Die Genauigkeiten bei der Bestimmung der Molmassen und die erzielten Verringerungen der Analysenzeiten liegen in Bereichen, die für den Einsatz in der kombinatorischen Materialforschung geeignet sind. Im Oligomerbereich gelingt es aus prinzipiellen Gründen nicht, unter Beibehaltung der Auflösung die gleiche Beschleunigung der Analysen zu erreichen.

### 3.2 Schnelle SEC in Dimethylacetamid (DMAc)

Es ist bekannt, dass die SEC von hydrophilen Polymeren mit erheblichen experimentellen Schwierigkeiten verbunden ist. So führt das Vorliegen stark polarer funktioneller Gruppen in der Polymerkette zur Assoziatbildung der Polymermoleküle untereinander oder mit dem Lösungsmittel. In vielen Fällen wird der SEC-Trennmechanismus gestört und es werden schlecht reproduzierbare bzw. falsche Ergebnisse erhalten. Es ist deshalb immer noch eine Herausforderung, die in der SEC von hydrophilen Copolymeren auftretenden chromatographischen Effekte systematisch zu untersuchen und Methoden zu erarbeiten, die eine genaue und reproduzierbare Molmassenbestimmung gestatten.

Eine chromatographische Methode zur Molmassenbestimmung von Methacrylsäure-haltigen Copolymeren wurde von Adler entwickelt<sup>91-93</sup>. Die experimentellen Bedingungen waren wie folgt:

stationäre Phase: GRAM (Polyestermaterial) 100 Å + 3000 Å von PSS GmbH

mobile Phase: DMAc + 50 mmol Essigsäure + 3 g/l LiBr

Detektor: RI

Säulentemperatur: 60 °C

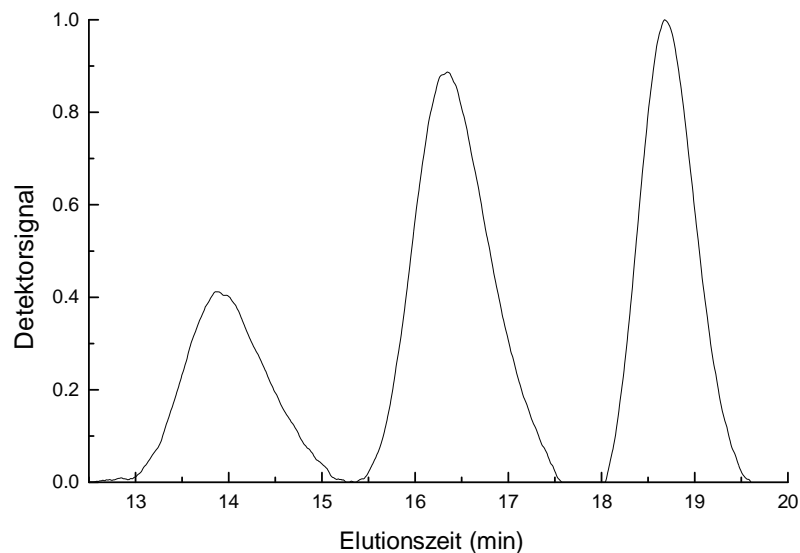
Da die vorliegende Methode mit konventionellen SEC-Säulen arbeitet, ist der Zeitbedarf pro Messung mit ca. 30 min zu hoch für Anwendungen im Bereich der kombinatorischen Materialforschung. Ziel der Arbeiten war es daher, die Methode auf schnelle Säulen zu übertragen und den Einfluss der Flussrate auf die Reproduzierbarkeit der Molmassenbestimmung und der Trennleistung zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurden vergleichende Messungen von PMMA-Standards und einem Retentionszeitmarker (Anthracen) in reinem DMAc durchgeführt. Ziel war es hier, den Zusammenhang zwischen Säulendimension, Flussrate und Trennleistung zu untersuchen. Für konventionelle Säulen wurden schon bei moderaten Steigerungen der Flussrate Drücke erreicht, die die abgeschätzte Stabilitätsgrenze des Säulenmaterials überschritten. Dementsprechend betrug hier die maximal anwendbare Flussrate 1,5 ml/min. Höhere Flussraten konnten nur mit „High Speed“-Säulen getestet werden. Hier liegt der Säulengegendruck auch bei Flussraten von 6 ml/min noch im akzeptablen Bereich. Die flussabhängig in reinem DMAc gemessenen Bodenzahlen und Retentionszeiten für den Referenzpeak des Anthracens sind für die konventionelle und die „High Speed“-Säulen in Tab. 3.2 gegenübergestellt.

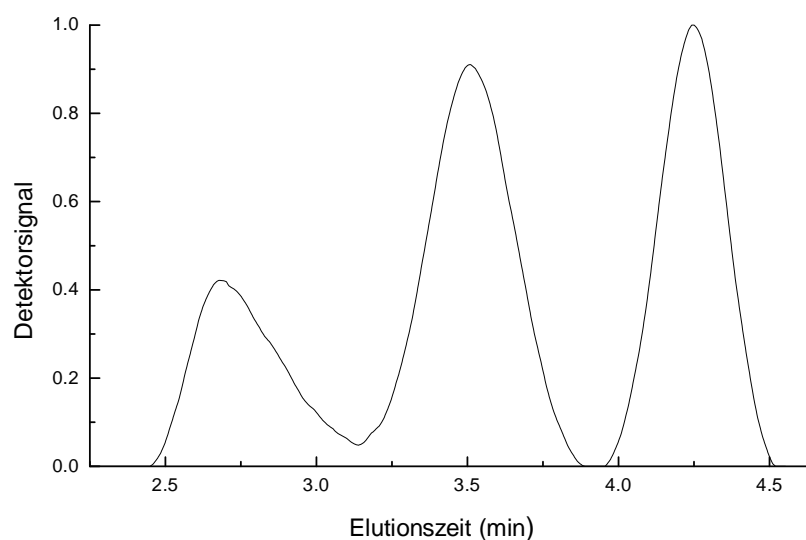
**Tab. 3.2** Flussabhängig gemessene Bodenzahlen und Retentionszeiten für Anthracen; stationäre Phase: GRAM 1000 Å + 3000 Å

Säulendimension	Flussrate (ml/min)	$t_R$ (min)	N (1/m)
300 x 8 mm	0.5	43.2	12600
	1	21.9	13800
	1.5	14.9	11400
50 x 20 mm	1	25.1	22000
	2	12.8	30000
	3	8.7	33000
	4	6.6	33000
	5	5.5	32000
	6	5.0	31000

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sich der Einfluss der Flussrate auf die Bodenzahl bei den Säulensystemen unterscheidet. Während bei einem Säuleninnendurchmesser von 8 mm die Bodenzahl mit steigender Flussrate abnimmt, bleibt die Trennleistung bei einem Säuleninnendurchmesser von 20 mm über einen weiten Flussratenbereich konstant. So wird trotz wesentlich kürzerer Messzeiten auch bei einem Fluss von 6 ml/min noch eine hohe Bodenzahl erreicht. Die Auftrennung von PMMA-Standards bei Flussraten von 1 bzw. 6 ml/min ist in Abb. 3.7 und 3.8 gezeigt.



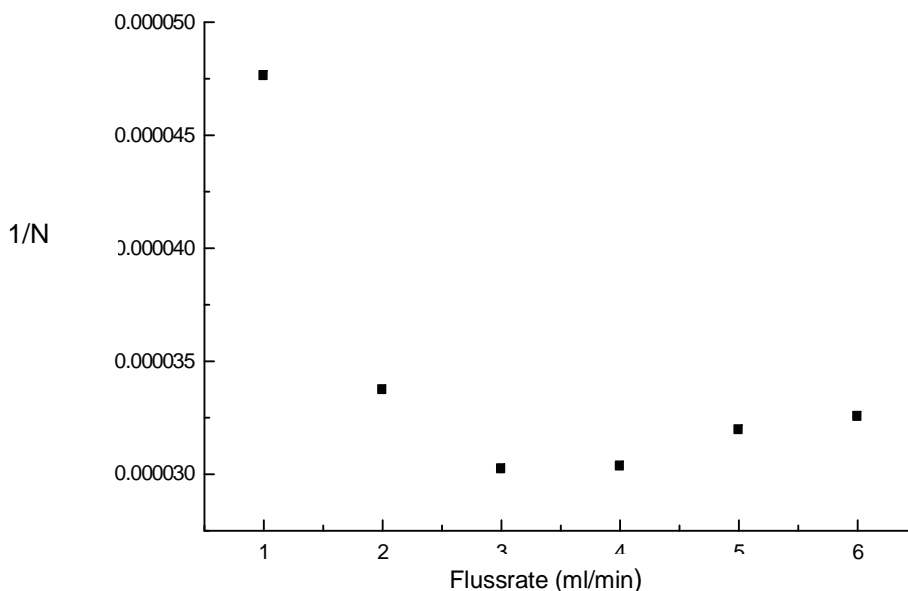
**Abb. 3.7** Auftrennung von 3 PMMA-Standards; stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000', 300 x 8 mm I.D., mobile Phase: DMAc, Proben: PMMA  $4 \cdot 10^3$ ,  $6 \cdot 10^4$ ,  $7 \cdot 10^5$  g/mol, 60 °C, Fluss: 1 ml/min



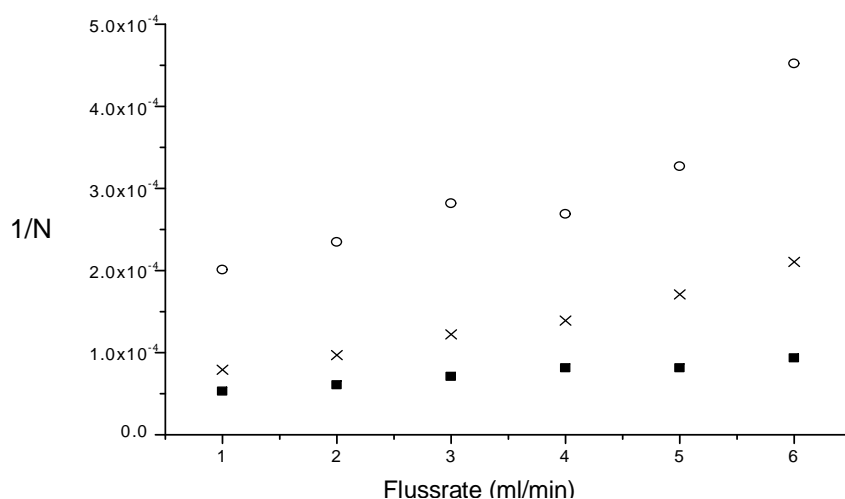
**Abb. 3.8** Auftrennung von 3 PMMA-Standards; stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000' High Speed, 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: DMAc, Proben: PMMA  $4 \cdot 10^3$ ,  $6 \cdot 10^4$ ,  $7 \cdot 10^5$  g/mol, 60 °C, Fluss: 6 ml/min



Weitere interessante Informationen über die chromatographische Leistung der „High Speed“-Säulen können aus den van Deemter-Kurven abgeleitet werden (Abb. 3.9 und 3.10).



**Abb. 3.9** Van Deemter-Kurven für Anthracen bei der schnellen SEC, stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000', 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: DMAc, T = 60 °C

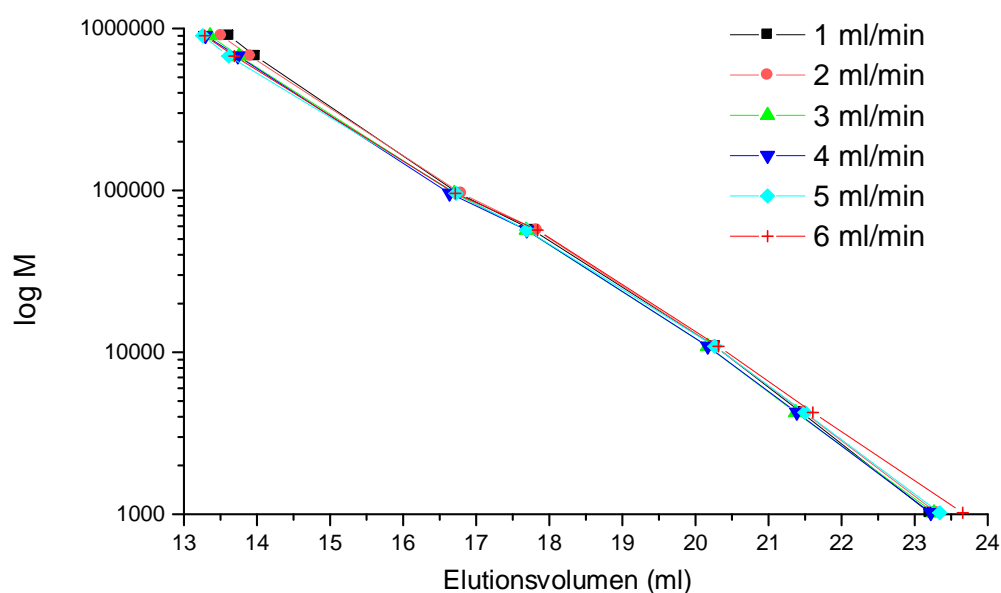


**Abb. 3.10** Van Deemter-Kurven für verschiedene PMMA-Standards (○: M = 675000 g/mol, x: 57000 g/mol, ■: M = 1040 g/mol) bei der schnellen SEC, stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000', 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: DMAc, T = 60 °C

Vergleicht man die van Deemter-Kurven, so erkennt man bei niedrigen Molmassen (Anthracen) das typische Verhalten mit einem Minimum der

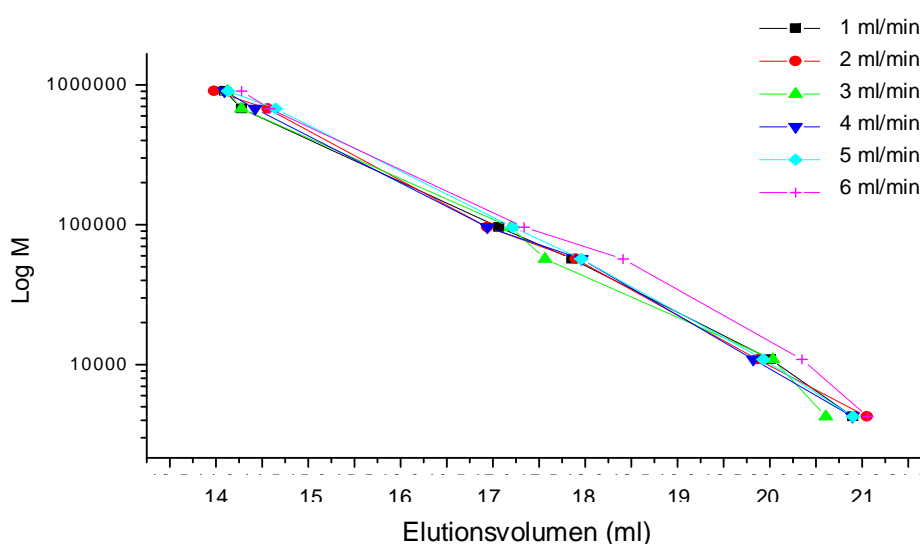
Bodenhöhe bei einer Flussrate zwischen 3 und 4 ml/min entsprechend einer linearen Flussgeschwindigkeit von ca. 0.4 mm/s (Abb. 3.9). Auch bei Verwendung von Standardsäulen liegt das Minimum der van Deemter-Kurve bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min, was einer linearen Flussrate von 0.46 mm/s entspricht. Für größere Molmassen wird das Minimum der Bodenhöhe nicht mehr erreicht (Abb. 3.10). Der Grund hierfür ist in der verringerten Diffusionsgeschwindigkeit der Makromoleküle zu suchen. Ein Teil der Probe wandert in die Pore und bleibt dort hinter dem in der mobilen Phase weitergewanderten Teil zurück. Je länger die Probe in der Pore verbleibt (je kleiner der Diffusionskoeffizient), desto stärker wird der Peak verbreitert.

Wie bereits diskutiert, muss auch der Einfluss einer Erhöhung der Flussrate auf die Kalibrationskurven untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Kalibrationskurven für PMMA auf „High Speed“-Säulen bei verschiedenen Flussraten aufgenommen (Abb. 3.11). Man kann erkennen, dass die Flussrate keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Kalibrationskurven hat. Die Analysenzeiten werden jedoch um den Faktor 6 reduziert, wenn man die Flussrate von 1 auf 6 ml/min erhöht.



**Abb. 3.11** Flussratenabhängigkeit der Kalibrationskurven von PMMA bei der schnellen SEC, stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000', 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: DMAc, T = 60 °C

Die Untersuchungen von engverteilten PMMA-Standards haben gezeigt, dass in reinem DMAc auf Säulen der Dimension 50 x 20 mm I.D. auch bei Flussraten von 6 ml/min eine gute Säulenperformance bezüglich der Bodenzahlen und Auflösung besteht. Im nächsten Schritt wurde nun versucht, die zuvor von Adler entwickelte Methode für Methacrylsäure-haltige Polymethacrylate auf diese Säulen zu übertragen. Dazu wurde die mobile Phase von reinem DMAc auf DMAc+LiBr+AcOH umgestellt. Erneut wurden flussratenabhängig die Bodenzahlen und Auflösungen bestimmt. Im nächsten Schritt wurden die Molmassen technischer Methacrylsäure-haltiger Copolymere bei hohen Flussraten gegen PMMA-Kalibrationskurven, die unter gleichen Flussraten erstellt wurden, gemessen. Die erhaltenen Kalibrationskurven für Flussraten von 1-6 ml/min sind in Abb. 3.12 zusammengefasst.



**Abb. 3.12** Kalibrationskurven von PMMA bei der schnellen SEC, stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000 Å, 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: DMAc+LiBr+AcOH, T = 60 °C

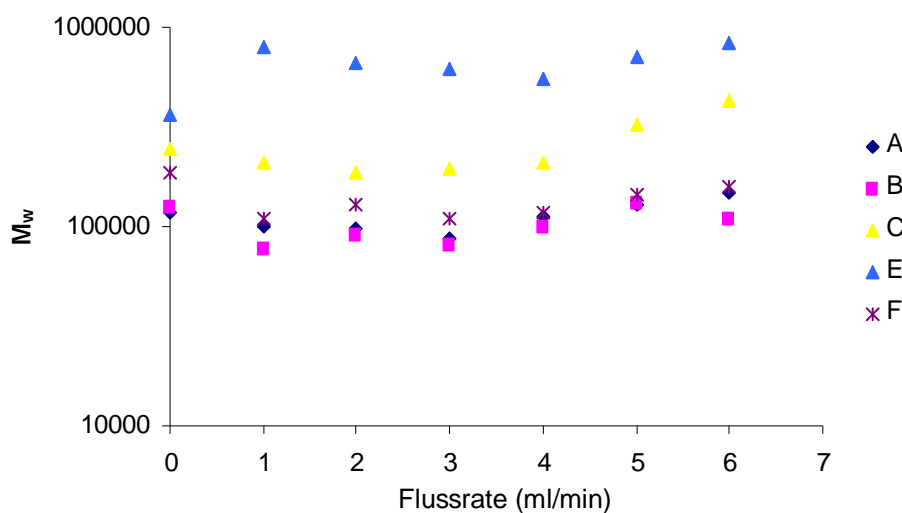
Hier zeigt sich, dass die Kalibrationskurven bis zu einer Flussrate von 5 ml/min recht gut übereinstimmen. Erst ab 6 ml/min kommt es zu kleinen Abweichungen in den Elutionsvolumina der PMMA-Standards. Die Steigung der Kalibrationkurve und damit die spezifische Auflösung und Trennleistung bleibt jedoch unverändert.

Für die Bestimmung der Molmassen an technischen Proben wurden sechs Co- bzw. Terpolymere mit unterschiedlichen Methacrylsäuregehalten von der Firma Röhm GmbH zur Verfügung gestellt (Tab. 3.3).

**Tab. 3.3** Übersicht über die anionischen Copolymere vom Typ EUDRAGIT® und ihre Zusammensetzung (MAS: Methacrylsäure, MMA: Methylmethacrylat, MA: Methylacrylat, EA; Ethylacrylat)

Probe	Durch Viskosimetrie ermittelter Molmassenbereich (g/mol)	MAS (Gew.%)	MMA (Gew.%)	MA (Gew.%)	EA (Gew.%)
A	50.000-100.000	30	70	-	-
B	100.000-200.000	50	50	-	-
C	100.000-300.000	50	-	-	50
D	500.000-1.000.000	-	30	-	70
E	100.000-500.000	10	25	65	-

Alle Proben wurden mit der bereits beschriebenen Methode chromatographisch bei unterschiedlichen Flussraten untersucht. Die gemessenen  $M_w$ -Werte für die Eudragit®-Copolymere A - C, E und F bei Flussraten von 1 - 6 ml/min sind in Abb. 3.13 zusammengefasst. Im Nullpunkt sind die Werte aus der konventionellen SEC aufgetragen.



**Abb. 3.13** Molmassenbestimmung von Methacrylsäure-Copolymeren durch schnelle SEC, stationäre Phase: GRAM 100 Å + 3000 Å, 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: DMAc+LiBr+AcOH, T = 60 °C, Kalibration: PMMA, für jede Flussrate wurde eine Kalibrationskurve erstellt

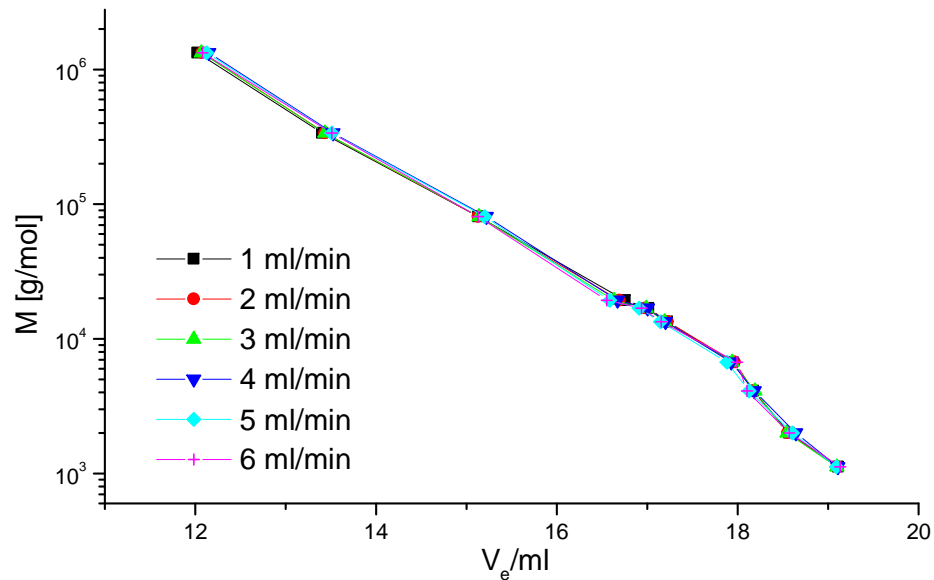
Wie Abb. 3.13 zeigt, treten bei der Molmassenbestimmung flussratenabhängige Schwankungen auf. Insbesondere bei Probe C ist eine deutliche Erhöhung der gemessenen mittleren Molmasse mit höherer Flussrate zu beobachten. Da die Messungen an den engverteilten PMMAs einerseits eine gute Reproduzierbarkeit der Kalibrationskurven lieferten, die Messungen an den technischen säurehaltigen Methacrylaten andererseits jedoch zu Schwankungen der erhaltenen Molmassen führten, wurde angenommen, dass entweder Polydispersitäts- oder Ladungseffekte für die Unterschiede verantwortlich sind.

### 3.3 Schnelle SEC in Wasser

Von der Firma Polymer Standards Service GmbH wurde zur Bestimmung der Molmasse von Na-Polystyrolsulfonaten eine SEC-Methode mit wässrigen Eluenten entwickelt<sup>94</sup>. Polystyrolsulfonate sind Polymere, die u.a. im pharmazeutischen Bereich als Antidots gegen Lithiumionen verwendet werden. Bei der Entwicklung der Methode ist eine Reihe von Aspekten bezüglich der Wahl der stationären und mobilen Phase zu beachten. Da Polystyrolsulfonat sowohl unpolare Phenylringe als auch stark polare ionische Gruppen enthält, erfordert die SEC-Analyse eine genaue Balance der hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Analyten, der mobilen und der stationären Phase. Rein wässrige Eluenten führen zu unpolaren Wechselwirkungen des Analyten mit der stationären Phase und somit zu Adsorptionseffekten. Daher verwenden die bisher existierenden SEC-Methoden wässrigen Eluenten unter Zusatz organischer Lösungsmittel. Bei zu hohen Anteilen an organischem Lösungsmittel kann es jedoch zu polaren Wechselwirkungen der ionischen Sulfonatgruppen mit der stationären Phase kommen. Der Einsatz von Mischlösungsmitteln, bestehend aus organischer und wässriger Phase, führt jedoch zu einer Reihe von Problemen. So verschlechtert sich die Stabilität der Basislinie des RI-Detektors, welcher als Standarddetektor bei der SEC verwandt wird, beim Einsatz von Mischlösungsmitteln. Zusätzlich kommt es schon durch leichte Veränderungen der Lösungsmittelzusammensetzung, z.B. durch Ausdampfen der leichtflüchtigen organischen Komponente, zu schlecht

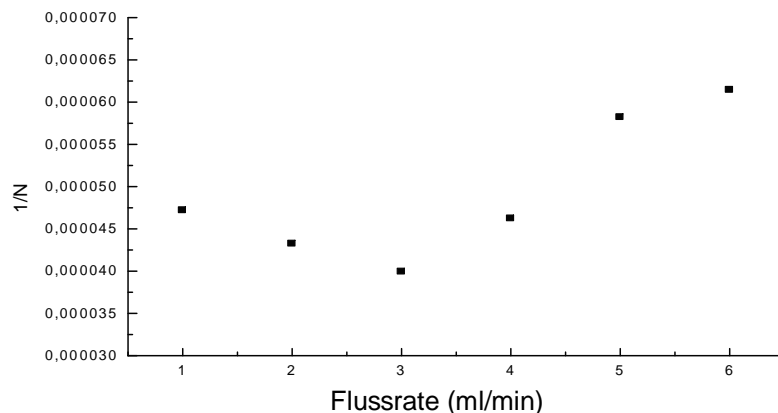
reproduzierbaren Elutionsvolumina und damit zu schlecht reproduzierbaren Molmassen. Die genannten Probleme konnten durch Verwendung rein wässriger Eluenten und Zugabe von Salz (Natriumdihydrogenphosphat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) gelöst werden. Bei der Wahl der stationären Phase ist zu beachten, dass eine ausgeglichene Balance zwischen polaren und unpolaren Eigenschaften der stationären Phase besteht. Diese Bedingung sollte bei Verwendung einer sulfonierten Polystyrolphase erfüllt sein. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur des Analyten und der stationären Phase sollte jede Veränderung der Wechselwirkung zwischen mobiler Phase und Analyt in einer gleichen Veränderung der Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase resultieren.

Zunächst wurden die Untersuchungen auf konventionellen Säulen (MCX, sulfonierte Polystyrolphase) der Dimension 300 x 8 mm I.D. durchgeführt. Unter Verwendung einer wässrigen Natriumdihydrogenphosphatlösung ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 11,88 g/l) als Eluenten gelang es, für Polystyrolsulfonat-Standards Chromatogramme zu erhalten, die keine Hinweise auf Aggregations- oder Adsorptionseffekte zeigten. Die Kalibrationskurven zeigten die erwartete Zunahme des Elutionsvolumens mit sinkender Molmasse. Im nächsten Schritt wurde die Performance einer Kombination von „High Speed“-Säulen MCX 1000 Å +  $10^5$  Å (50 x 20 mm I.D.) unter Variation der Flussrate untersucht. Hierzu wurden die Trennbodenzahlen als Funktion der Flussrate bestimmt. Analog zu den grundsätzlichen Untersuchungen an Polystyrolstandards zeigte sich erneut, dass die Trennbodenzahlen, die auf den schnellen Säulen erhalten werden, mit denen auf konventionellen Säulen vergleichbar sind. Anschließend wurden die Kalibrationskurven von engverteilten Polystyrolsulfonaten flussabhängig aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, dass im Flussbereich von 1 - 6 ml/min die Kalibrationskurven nahezu identisch sind, d.h. es können keine Flusseffekte beobachtet werden (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14** Kalibrationskurven von Polystyrolsulfonat-Standards bei der schnellen SEC, stationäre Phase: MCX 1000 Å +  $10^5$ , 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: Wasser + 11,88 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

Der Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung der Säulenkombination ist in Abb. 3.15 anhand der van Deemter-Kurve dargestellt.



**Abb. 3.15** Van Deemter-Kurve für einen Polystyrolsulfonat-Standard 2000 g/mol in der schnellen SEC, stationäre Phase: MCX 1000 Å +  $10^5$ , 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: Wasser+11,88 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

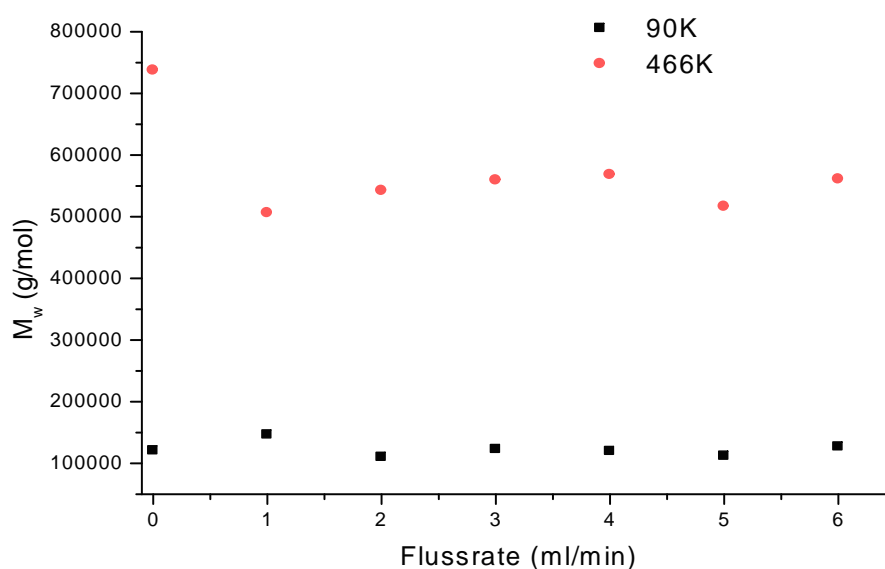
Auch im vorliegenden Fall wurde für die „High Speed“-Säulen eine hohe Trennleistung gefunden. Die geringste Bodenhöhe liegt bei einer Flussrate von etwa 3 ml/min, erhöht sich aber deutlich bei weiterer Steigerung der Flussrate. Dies bedeutet, dass die Säule ihre optimale Trennung bei 3 ml/min erreicht und sich die Trennleistung ab 4 ml/min verschlechtert. Ein Vergleich zwischen dem konventionellen und dem „High Speed“-System

belegt, dass trotzdem bei hohen Flussraten noch gute Trennleistungen erreicht werden (Tab. 3.3).

**Tab. 3.3** Flussabhängig gemessene Bodenzahlen, stationäre Phase: MCX 1000 Å +  $10^5$  Å

Säulendimension	Flussrate (ml/min)	Bodenzahl (1/m)
300 x 8 mm	1	9000
50 x 20 mm	1	21200
	2	23100
	3	25000
	4	21600
	5	17200
	6	16300

Um schließlich die Genauigkeit der Molmassenbestimmung auf den schnellen Säulen abzuschätzen, wurden breitverteilte Polystyrolsulfonate unter Variation der Flussrate vermessen und die Molmassenmittelwerte bestimmt. Die so erhaltenen Werte wurden mit den auf konventionellen Säulen ermittelten Molmassenmittelwerten (Messpunkte, die in Abb. 3.16 bei Flussrate 0 ml/min eingezeichnet sind) verglichen.

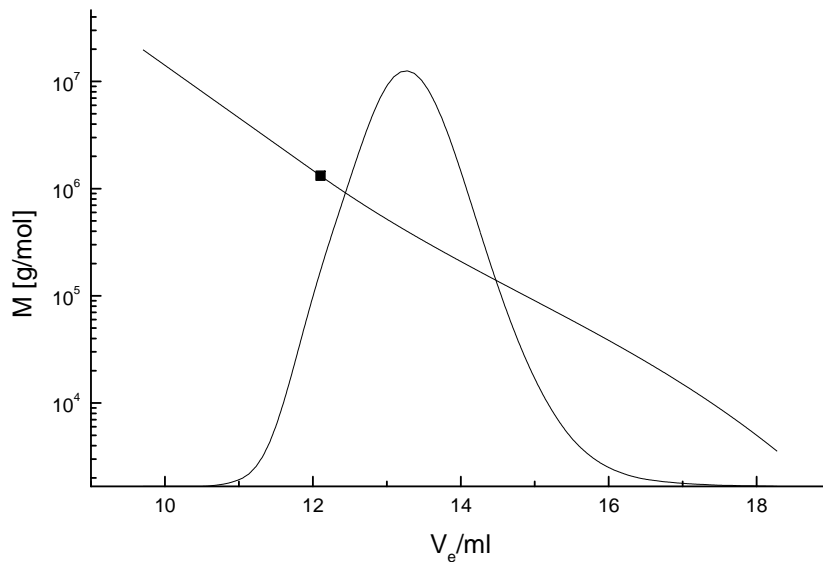


**Abb. 3.16** Molmassenbestimmung von breitverteilten Polystyrolsulfonat-Proben durch schnelle SEC, stationäre Phase: MCX 1000 Å +  $10^5$  Å, 50 x 20 mm I.D., mobile Phase: Wasser + 11,88 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Kalibration: Polystyrolsulfonat



Für die Probe mit der Molmasse von 90000 g/mol erhält man dabei eine gute Übereinstimmung im Vergleich zur konventionellen Säule und auch zwischen den unterschiedlichen Flussraten. Die hochmolekulare Probe (446K) dagegen zeigt auf den konventionellen Säulen eine höhere Molmasse als auf den schnellen Säulen.

Bei einer Kombination von 2 SEC-Säulen sollte das Ausschlussvolumen im Bereich zwischen 10-12 ml auftreten.



**Abb. 3.17** Elugramm des breitverteilten Polystyrolsulfonates ( $M = 466000$  g/mol) im Vergleich zur Kalibrationskurve. Der Punkt bei  $1,3 \cdot 10^6$  g/mol repräsentiert den letzten Kalibrationspunkt. Die Molmassen bei kleineren Elutionsvolumina sind linear extrapoliert.

Wie man in Abb. 3.17 erkennen kann, beginnt hier auch der Elutionsbereich der breitverteilten Probe. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass signifikante Mengen der Probe schon am Ausschlussvolumen der Säulenkombination eluieren. Die SEC-Software führt bei Elutionsvolumina, die kleiner sind als das Elutionsvolumen des höchstmolekularen Kalibrationspunktes, eine lineare Extrapolation der Kalibrationskurve durch (Abb. 3.17). Da jedoch in diesem Bereich die tatsächliche Kalibrationskurve stark ansteigen sollte, werden durch Verwendung der linearen Extrapolation deutlich zu kleine Molmassen erhalten. Hierdurch fallen auch die erhaltenen Molmassenmittelwerte zu niedrig aus. Zusätzlich weiß man, dass hochmolekulare Proben empfindlich auf Säulenüberladung reagieren, wodurch im Allgemeinen ebenfalls eine Verschiebung in Richtung niedrigerer

Molmassen resultiert. Da die Molmasse der Probe mit geringerer Molmasse mit den Ergebnissen auf konventionellen Säulen vergleichbar ist, kann man aus den vorliegenden Experimenten den Schluss ziehen, dass die neu entwickelte Methode für die Molmassenbestimmung von Polystyrolsulfonaten auch auf schnelle Säulen übertragen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es möglich ist, bestehende Methoden für die Molmassenbestimmung von Methacrylsäure-haltigen Polyalkylmethacrylaten und von Polystyrolsulfonaten in rein wässrigen Eluenten auf schnelle Säulen zu übertragen. Obwohl eine relativ große Streuung der Werte zu beobachten ist, sind die Ergebnisse mit denen von konventionellen Säulen vergleichbar. Damit sollte es möglich sein, diese Methoden z.B. in der schnellen Qualitätskontrolle einzusetzen.

#### **4 Schnelle kritische Chromatographie (LC-CC) von Polyethylenoxiden**

Eine der technisch wichtigsten Klassen von funktionellen Homopolymeren sind Alkyl- und Alkylphenoxy-terminierte Polyethylenoxide (PEO). Diese Oligomere und Polymere werden als amphiphile Tenside eingesetzt. Sie weisen eine hydrophile PEO-Polymerkette und eine hydrophobe Fettalkohol- oder Alkylphenoxy-Endgruppe auf. Die Produkte werden häufig durch anionische Polymerisation von Ethylenoxid in Gegenwart eines Gemisches von Fettalkoholen mit unterschiedlicher C-Kettenlänge hergestellt und weisen dementsprechend unterschiedliche Endgruppen auf. Für das Verständnis der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen ist es wichtig, die Art und den Anteil der verschiedenen Endgruppen quantitativ zu bestimmen.

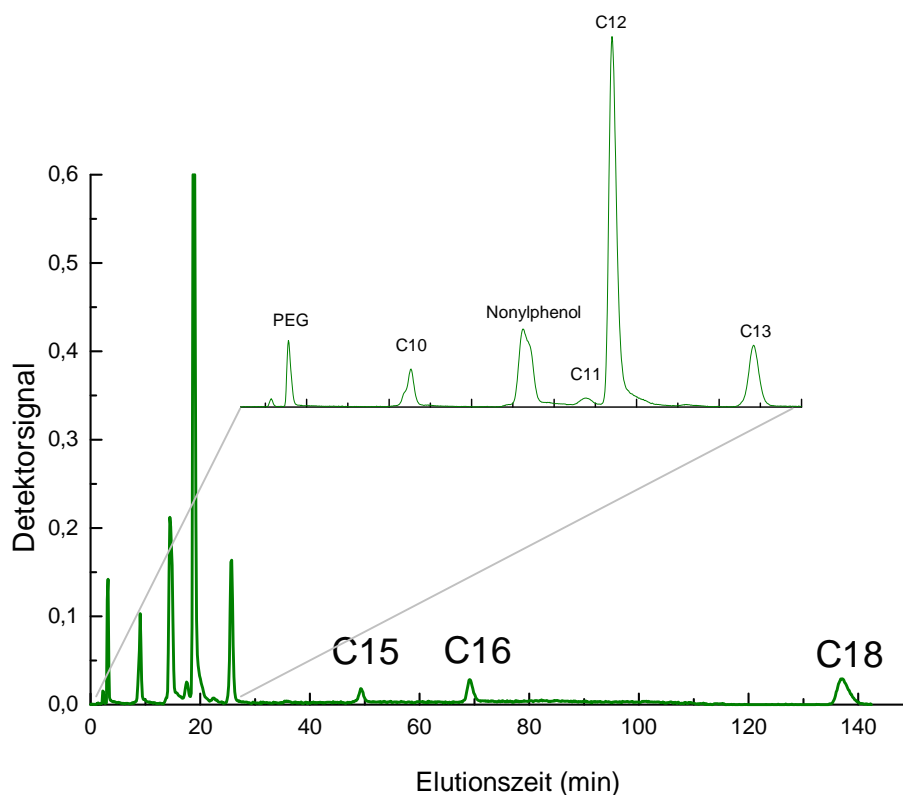
Die selektive Auftrennung von Polyethylenoxiden nach den Endgruppen kann durch Flüssigchromatographie am kritischen Punkt der Adsorption (LC-CC) erreicht werden. Typischerweise wird die Trennung auf einer Umkehrphase RP-18 und einer mobilen Phase aus Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser durchgeführt<sup>95-99</sup>. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Trennung unabhängig von der Molmasse ausschließlich nach den Endgruppen. Wegen der hydrophilen Eigenschaften der stationären Phase erfolgt die Auftrennung in Richtung zunehmender C-Kettenlänge der Endgruppen. Eine ausreichend gute Trennleistung wird auf einer RP-18 mit 250 mm x 4,6 mm I.D. Säulendimension und 5 µm Partikelgröße erreicht. Bei einer Flussrate von 1 ml/min betragen typische Analysenzeiten ca. 30-40 min.

Ein wichtiges Kriterium zur Bewertung des Einflusses von chromatographischen Parametern und unterschiedlichen stationären Phasen ist die Trennleistung, die anhand der Bodenzahl und Auflösung bestimmt wird. Zu deren experimenteller Messung wurde als Modell ein Substanzgemisch gewählt, das Polyethylenoxide mit unterschiedlichen Endgruppen enthält. Dieses wurde aus technischen PEOs der Fa. BASF AG zusammengestellt. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Komponenten sowie die mittleren Polymerisationsgrade gibt Tab. 4.1. Das

Referenzchromatogramm, aufgenommen auf einer konventionellen stationären Phase, ist in Abb. 4.1 dargestellt.

**Tab. 4.1** Modellmischung von Polyethylenoxiden mit verschiedenen Endgruppen (R) und mittleren Polymerisationsgraden (n), HO-(EO)<sub>n</sub>-R

Komponente	n	R
1	7	<i>i</i> C <sub>10</sub>
2	7	<i>n</i> C <sub>12</sub>
3	10	Nonylphenyl
4	8	<i>i</i> C <sub>13</sub>
5	7	Mischung aus <i>i</i> C <sub>13</sub> , <i>n</i> C <sub>13</sub> , <i>n</i> C <sub>15</sub>
6	6	Mischung aus <i>n</i> C <sub>16</sub> , <i>n</i> C <sub>18</sub>

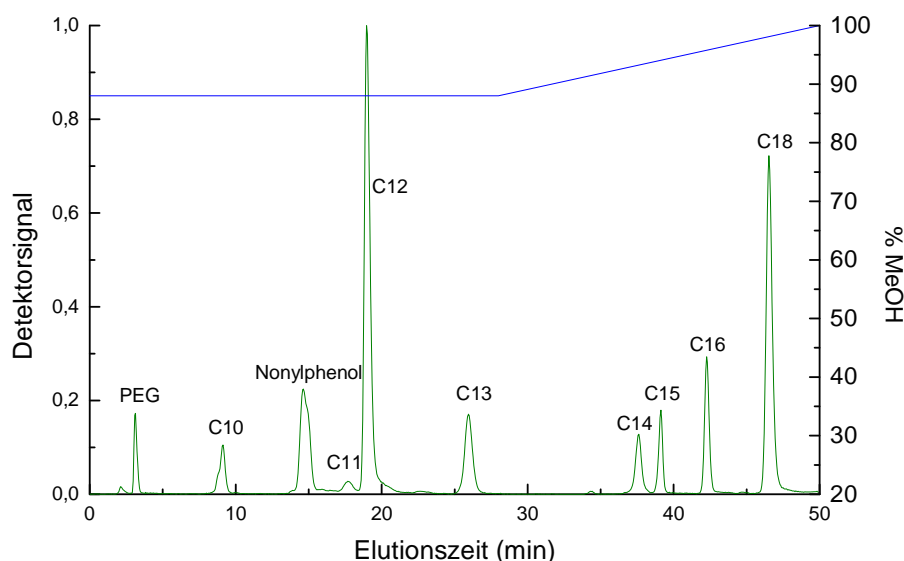


**Abb. 4.1** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch LC-CC, stationäre Phase: M&N Nucleosil C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 88:12 v/v. Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1

Das Referenzchromatogramm zeigt, dass alle Komponenten der Mischung eine Basislinientrennung aufweisen. Zur Bewertung der Trennleistung der Säule wird die Bodenzahl anhand des C<sub>10</sub>-Peaks bestimmt. Die Auflösung

wird aus den Peaks C<sub>12</sub> und Nonylphenyl berechnet. Im vorliegenden Fall beträgt die Bodenzahl 14400 m<sup>-1</sup> und die Auflösung 7,74.

Wie Abb. 4.1 zeigt, ist der für die Trennung erforderliche Zeitbedarf bei 1 ml/min mit ca. 140 min sehr hoch. Die Trennzeit kann bei gleicher Trennleistung verkürzt werden, wenn anstelle der isokratischen Methode ein Gradient eingesetzt wird. Dabei wird isokratisch mit einer mobilen Phase begonnen, die der kritischen Eluentenzusammensetzung entspricht. Nach ca. 20 min wird der Anteil an MeOH im Eluenten linear erhöht, wodurch die spät eluierenden Peaks komprimiert werden und früher eluieren (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch Gradienten-HPLC, stationäre Phase: M&N Nucleosil C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser, Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1

Durch Anwendung der Gradientenmethode konnte die Analysenzeit von 140 auf ca. 50 min reduziert werden. Für die untersuchte Säule in Abb. 4.2 beträgt die Bodenzahl 12600 m<sup>-1</sup> und die Auflösung 7,53. Damit bleibt die Säulenleistung im Vergleich mit der isokratischen Analyse erhalten, während die Analysenzeit deutlich reduziert wird. Für eine Anwendung dieser Methode im High-Throughput-Screening ist es jedoch erforderlich, dass eine vergleichbare Trennleistung bei weiter deutlich reduzierter Analysenzeit erreicht wird.

Dies ist zum einen möglich, wenn stationäre Phasen mit geringerer Partikelgröße eingesetzt werden. Eine geringere Partikelgröße der stationären Phase erhöht bei gleichem Volumen die Gesamtoberfläche und damit die Anzahl der wechselwirkenden Gruppen. Auf diese Weise erhöht sich auch die Trennleistung. Gleichzeitig wird zur Verringerung des Gegendrucks die Säulenlänge reduziert. Damit ist es nun möglich, die Flussrate zu erhöhen und die Analysenzeit zu verkürzen. Für eine systematische Abklärung der mit verschiedenen stationären Phasen erhältlichen Trennleistungen und Messzeiten wurde ein Screening mit den in Tab. 4.2 zusammengestellten Säulen durchgeführt.

**Tab. 4.2** Stationäre Phasen für das HPLC-Säulenscreening

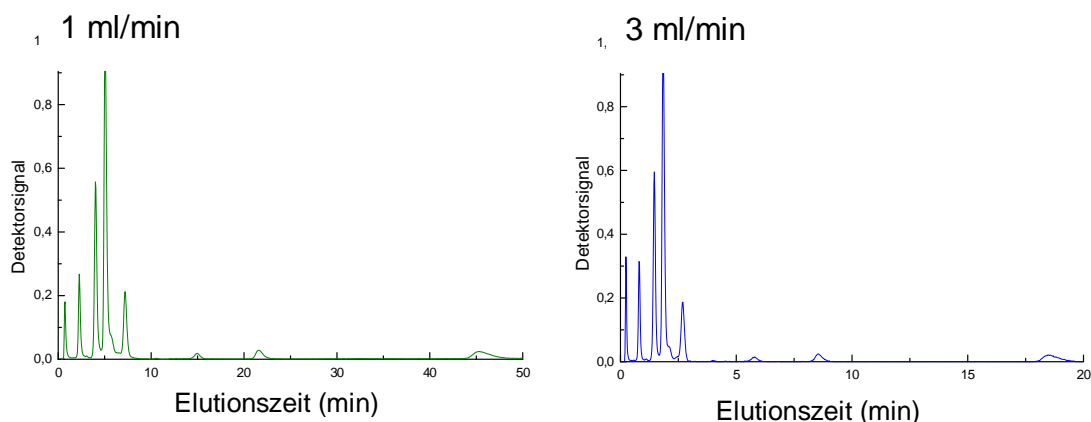
Säule	Hersteller	Dimensionen (Länge x I.D. in mm)
Nucleosil C <sub>18</sub>	Macherey-Nagel	250 x 4,6
Chromolith C <sub>18</sub>	Merck	100 x 4,6
Chromolith C <sub>18</sub>	Merck	50 x 4,6
Chromolith C <sub>8</sub>	Merck	100 x 4,6
Luna C <sub>18</sub>	Phenomenex	30 x 4,6
XTerra C <sub>18</sub>	Waters	30 x 4,6

Bei XTerra® der Firma Waters handelt es sich um ein neues organisch-anorganisches Basismaterial, welches die Vorteile von Kieselgel und organisch-polymerbasierter stationärer Phase vereinigt. Dieses Material zeichnet sich durch mechanische Festigkeit, hohe Trennleistung, breite Anwendbarkeit sowie hohe chemische und thermische Stabilität bei geringem Peak tailing aus. Luna® der Firma Phenomenex besteht aus hochreinen metallfreien Kieselgel-Partikeln, die äußerst glatt und sphärisch sind. Diese weisen eine chemisch einheitliche Oberfläche und somit eine ausgeglichene Verteilung an funktionellen Gruppen auf. Chromolith™ der Firma Merck ist ein monolithischer Kieselgelstab mit Makro- und Mesoporen für hohe Flussraten und niedrige Gegendrücke (siehe auch Kap. 2).

## 4.1 Isokratische Methoden

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden partikuläre stationäre Phasen vom Typ RP-18 untersucht. Die mittleren Partikelgrößen betragen 3 bzw. 2,5  $\mu\text{m}$  anstelle der üblichen 5  $\mu\text{m}$ . Die Säulendimensionen betragen in beiden Fällen 30 x 4,6 mm I.D. Durch die geringere Säulenlänge gegenüber konventionellen Säulendimensionen ist der Rückdruck geringer und Flussraten bis zu 3 ml/min können genutzt werden.

Die Trennung der Modellmischung auf der stationären Phase **Luna C<sub>18</sub>** bei verschiedenen Flussraten und die Bestimmung der entsprechenden Trennleistungen sind in Abb. 4.3 und Tab. 4.3 zusammengefasst.



**Abb. 4.3** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch LC-CC, stationäre Phase: Luna C<sub>18</sub>, 30 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 79:21 v/v, Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1, Peakzuordnung wie in Abb. 4.1

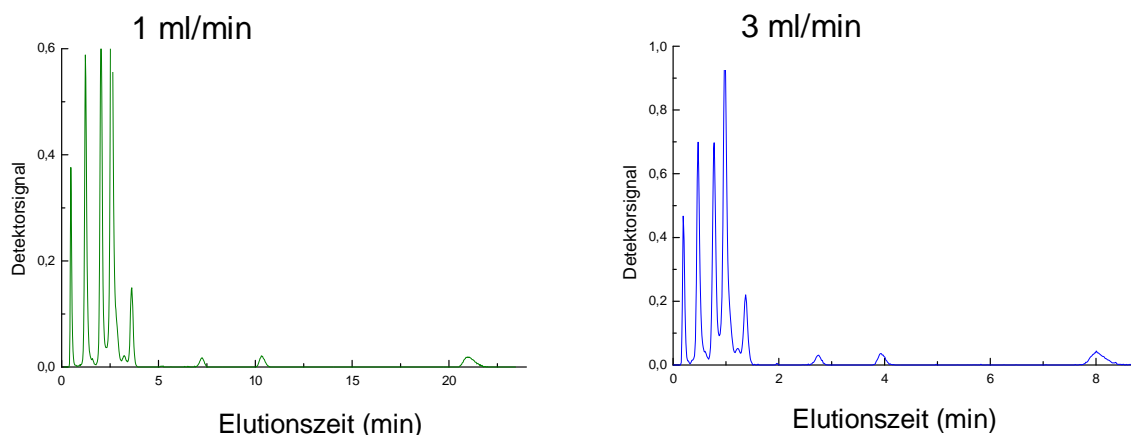
**Tab. 4.3** Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung der Säule, stationäre Phase: Luna C<sub>18</sub>, 30 x 4,6 mm I.D.

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	48,5	20500	3,63
2	26	22100	3,69
3	19,6	21000	3,65

Die Bodenzahl wurde am C<sub>10</sub>-Peak und die Auflösung zwischen C<sub>12</sub>- und Nonylphenyl-Peak bestimmt. Die Luna-Säule zeigt aufgrund der höheren Bodenzahl eine bessere Leistung als die Nucleosil-Säule (Abb. 4.1). Eine

Erklärung für das um 50 % verringerte Auflösungsvermögen der Luna-Säule könnte in deren Länge liegen, die nur 12 % der Nucleosil-Säule beträgt. Trotz der Länge von nur 30 mm sind jedoch auch auf der Luna-Säule alle Komponenten voneinander getrennt. Das zeigt sehr klar, dass verringerte Korngrößen zu einer deutlichen Verbesserung der Trennleistung führen. Eine Erhöhung der Flussrate von 1 auf 3 ml/min verringert die Trennleistung nicht, die Analysenzeit wird jedoch von 50 auf 20 min verkürzt.

Eine ähnliche Trennleistung zeigt auch das Material *XTerra* der Fa. Waters. Die Korngröße beträgt hier 2,5  $\mu\text{m}$  und die Säulenlänge 30 mm. Auch in diesem Fall wird eine gute Auftrennung der Modellmischung beobachtet (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch LC-CC, stationäre Phase: XTerra C<sub>18</sub>, 30 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v, Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1, Peakzuordnung wie in Abb. 4.1

**Tab. 4.4** Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung der Säule, stationäre Phase: XTerra C<sub>18</sub>, 30 x 4,6 mm I.D., Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	21,0	21400	4,08
2	11,5	16700	3,43
3	8,0	12700	2,86

Im Vergleich zur Luna-Säule nimmt allerdings die Trennleistung der XTerra-Säule mit steigender Flussrate deutlich ab. Bei einer Flussrate vom 3 ml/min betragen N und R<sub>s</sub> nur noch 60 % der entsprechenden Werte bei 1 ml/min.



Damit ist bei einem Fluss von 3 ml/min die Trennleistung der XTerra deutlich geringer als die der Luna. Andererseits beträgt die benötigte Analysenzeit bei der XTerra nur 8 min, während bei der Luna 20 min benötigt werden. Dies bedeutet bei den gleichen Säulendimensionen und der gleichen Flussrate eine Zeit- und Lösungsmittelsparnis um den Faktor 2,5. Auch hier zeigt sich also, dass bei der Bewertung von schnellen Trennungen neben der Trennleistung weitere Kriterien berücksichtigt werden müssen. Aufgrund der kleinen Korngröße von 3 bzw. 2,5  $\mu\text{m}$  entsteht jedoch schon bei einer Flussrate von 3 ml/min ein sehr hoher Säulengegendruck. Bei höheren Flussraten ist der Gegendruck so groß (240 bar für XTerra und 220 bar für Luna), dass eine Schädigung der stationären Phase nicht ausgeschlossen werden kann.

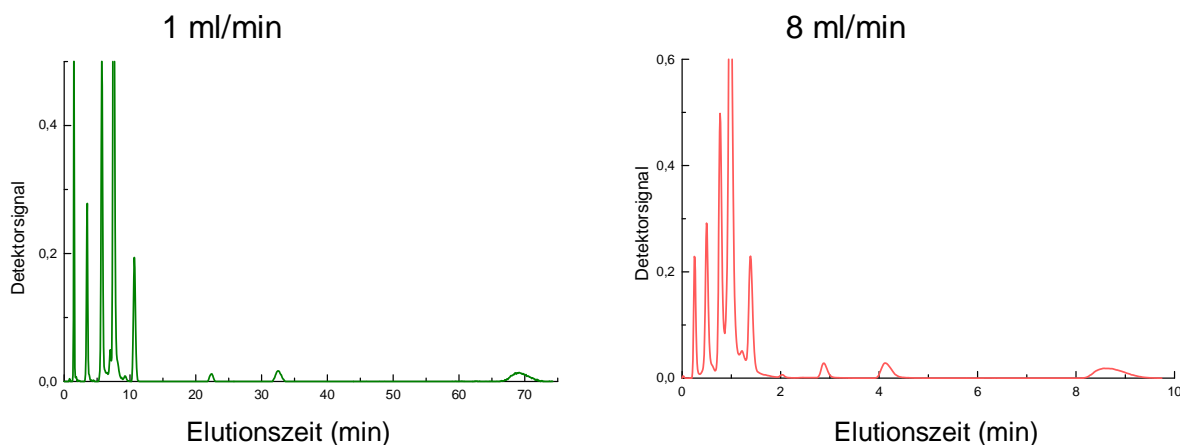
Der Säulengegendruck kann deutlich reduziert werden, wenn anstelle von partikulärem Säulenmaterial eine monolithische stationäre Phase verwendet wird. Durch die Kombination von Makro- und Mesoporen in einem starren Kieselgelgerüst gelingt es hier, bei geringem Säulengegendruck hohe Flussraten zu realisieren. Der Zusammenhang zwischen Flussrate und Säulengegendruck wurde für unterschiedliche Chromolith-Säulen untersucht (Tab. 4.6).

**Tab. 4.6** Einfluss der Flussrate auf den Säulengegendruck mit MeOH-H<sub>2</sub>O als mobiler Phase bei Chromolith-Säulen

Flussrate (ml/min)	Säulengegendruck (bar)		
	Chromolith C <sub>18</sub> 100 x 4.6 mm	Chromolith C <sub>18</sub> 50 x 4.6 mm	Chromolith C <sub>8</sub> 100 x 4.6 mm
1	74	21	74
2	102	59	55*
3	124	87	84*
4	149	117	102*
5	173	138	126*
6	196	176	149*
7	164*	195	175*

\* Eluent vor dem Detektor geteilt

Die Bewertung der Trennleistung dieser Säulen wurde wiederum mit der bereits beschriebenen Modellmischung aus PEOs unterschiedlicher Funktionalität durchgeführt. Die Trennungen erfolgten in der Nähe des kritischen Punktes mit einer mobilen Phase MeOH:H<sub>2</sub>O 80:20 v/v. Die unter diesen isokratischen Bedingungen gemessenen Chromatogramme bei Flussraten von 1 und 8 ml/min sind in Abb. 4.5 dargestellt.



**Abb. 4.5** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch LC-CC, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v, Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1, Peakzuordnung wie in Abb. 4.1.

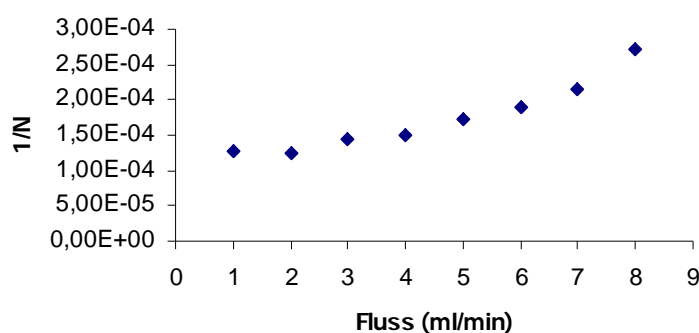
Wie die Chromatogramme in Abb. 4.5 zeigen, wird bei einer Flussrate von 1 ml/min auf der **Chromolith C<sub>18</sub> 100 x 4,6 mm I.D** eine Trennzeit von ca. 72 min benötigt. Die Trennleistung ist unter diesen Bedingungen sehr gut und die Peaks sind fast vollständig basisliniengetrennt. Bei einer Erhöhung der Flussrate auf 8 ml/min verkürzt sich die Trennzeit auf ca. 10 min. Auch unter diesen Bedingungen ist die Trennleistung noch ausreichend, um alle Komponenten mit der nötigen Präzision zu quantifizieren. Der Zusammenhang zwischen Trennleistung und Flussrate für das vorliegende System ist in Tab. 4.7 zusammengefasst.

**Tab. 4.7** Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung der Säule, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	74	7900	6,92
2	40,5	8100	5,74
3	27,8	6900	5,43
4	22,3	6600	5,33
5	19,2	5800	5,08
6	14,6	5300	4,94
7	13,2	4700	4,62
8	9,25	3700	2,82

Wie zu erwarten, sinken Bodenzahl und Auflösung der Säule mit steigender Flussrate. Beim Übergang von 1 auf 8 ml/min ergibt sich eine Verringerung der Trennleistung um ca. 50 %. Trotzdem wird auch unter diesen Bedingungen noch eine ausreichende Auftrennung der verschiedenen Komponenten erreicht (Abb. 4.5).

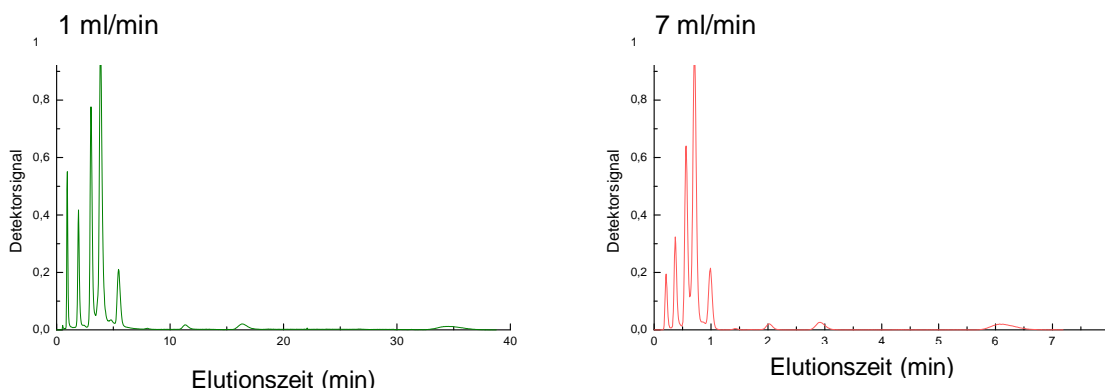
Das van Deemter-Verhalten der monolithischen stationären Phase ist in Abb. 4.6 dargestellt. Es zeigt sich, dass die höchste Trennleistung bei einer Flussrate von ca. 2 ml/min erreicht wird. Obwohl bei höheren Flussraten die Trennbodenzahl abnimmt, lassen sich alle Komponenten der Mischung identifizieren.



**Abb. 4.6** Van Deemter-Kurve für eine monolithische stationäre Phase, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v

Es ist also durch den Einsatz von monolithischen Säulenmaterialien möglich, die Trennzeit im Vergleich zu partikulären stationären Phasen unter gleichen Bedingungen um den Faktor 2 zu verkürzen (vergleiche Abb. 4.1 und 4.5). Durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auf 8 ml/min verringert sich die Analysenzeit um den Faktor 16. Eine weitere Verkürzung der Analysenzeit wird durch die Anwendung von Gradienten erreicht. Die optimierte Analysenzeit beträgt dann nur noch 2,25 min. Dies entspricht einer Gesamtverkürzung der Analysenzeit um den Faktor 64.

Neben der Erhöhung der Flussrate und dem Einsatz von Lösungsmittelgradienten können kürzere Analysenzeiten auch durch eine Verringerung der Säulenlänge erreicht werden. Hier ist aber zu berücksichtigen, dass auf diese Weise auch die Trennleistung der Säule reduziert wird. Die Auftrennung der Modellmischung bei unterschiedlichen Flussraten für eine **Chromolith C<sub>18</sub>** mit einer Säulenlänge von **50 mm** ist in Abb. 4.7 dargestellt. Anhand der für die Bestimmung der Auflösung genutzten Peaks „Nonylphenyl“ und „C<sub>12</sub>“ kann man erkennen, dass durch die Erhöhung der Flussrate von 1 auf 7 ml/min kein wesentlicher Verlust an Auftrennung beobachtet wird. Interessant ist ein Vergleich der Trennleistungen der beiden untersuchten monolithischen Säulen. Obwohl es sich definitionsgemäß um die gleiche stationäre Phase handelt, ist die Bodenzahl für die 50mm-Säule deutlich höher als für die 100 mm-Säule. Demgegenüber ist die Auflösung, also das Trennvermögen von benachbarten Peaks, deutlich geringer (Tab. 4.7 und 4.8).

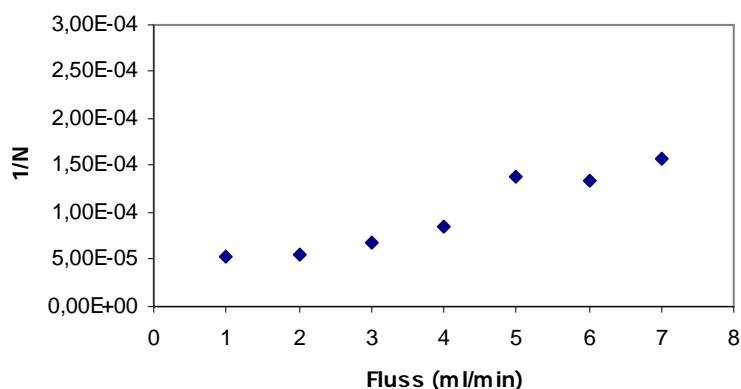


**Abb. 4.7** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch LC-CC, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 50 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1, Peakzuordnung wie in Abb. 4.1

**Tab. 4.8** Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung der Säule, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 50 x 4,6 mm; Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	37,4	19100	3,86
2	20,5	17800	3,83
3	14	14600	3,46
4	11	11700	3,45
5	9	7100	2,55
6	7,9	7500	2,56
7	6,7	6300	2,66

Ein Vergleich der van Deemter-Kurven in Abb. 4.6 und 4.8 zeigt, dass für beide Säulen etwa der gleiche Anstieg der Bodenhöhe mit zunehmender Flussrate beobachtet wird.

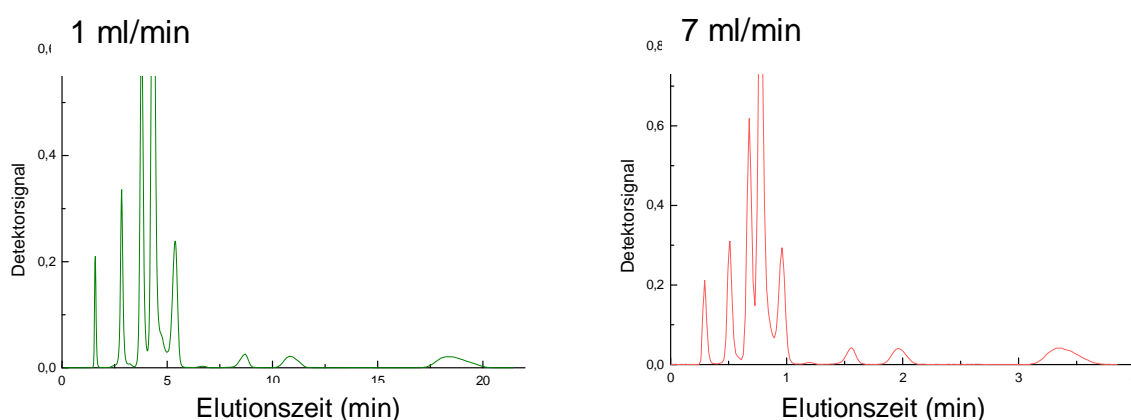


**Abb. 4.8** Van Deemter-Kurve für eine monolithische stationäre Phase, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 50 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v

Wie die Trennungen der Modellmischung gezeigt haben, kann eine deutliche Verringerung der Messzeit nur erreicht werden, wenn man Kompromisse bei der erreichbaren Trennleistung eingeht. Maximale Trennleistung bei gleichzeitig geringster Analysenzeit wird in aller Regel nicht erreichbar sein. Dementsprechend muss eine Bewertung der Eignung eines Trennverfahrens immer am konkreten Beispiel erfolgen. So zeigt ein Vergleich der

isokratischen Trennungen auf beiden Säulen, dass bei etwa gleicher Auftrennung der Peaks folgende minimale Analysenzeiten erreicht werden können: 100 mm-Säule – ca. 10 min bei einem Fluss von 8 ml/min (Abb. 4.5), 50 mm-Säule – ca. 6,5 min bei einem Fluss von 7 ml/min (Abb. 4.7).

Eine weitere Modifizierung der Trenneigenschaften kann erreicht werden, wenn die Hydrophobie/Hydrophilie der stationären Phase verändert wird. Bei den RP-18-Phasen besteht die chromatographisch aktive Oberfläche aus  $C_{18}$ -Alkylgruppen, die an das Kieselgelgerüst gebunden sind. Diese sind außerordentlich hydrophob und zeigen starke Wechselwirkungen mit unpolaren Molekülen oder Gruppen, wie etwa den Fettalkohol-Endgruppen der untersuchten PEOs. Dies führt zu relativ langen Elutionszeiten von PEOs mit  $C_{16}/C_{18}$ -Endgruppen.



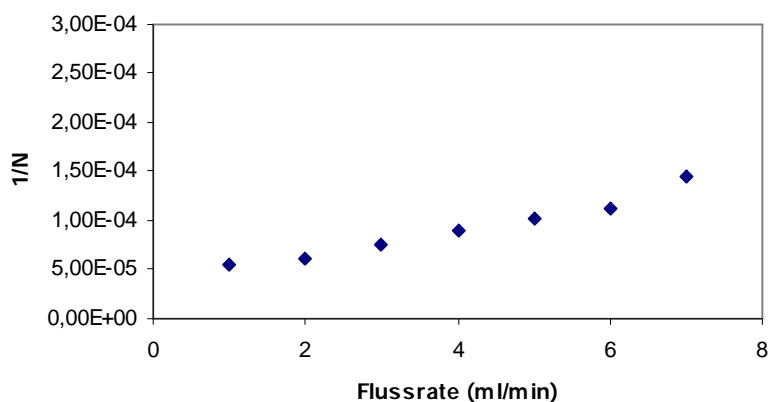
**Abb. 4.9** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch LC-CC, stationäre Phase: Chromolith  $C_8$ , 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v, Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1, Peakzuordnung wie in Abb. 4.1

Die Hydrophobie kann gesenkt werden, wenn  $C_8$ - anstelle von  $C_{18}$ -Alkylgruppen zur Trennung genutzt werden. Durch die verringerte Hydrophobie sollten die Wechselwirkungen mit der stationären Phase geschwächt werden und die Elutionszeiten sinken. Um dies zu untersuchen, wurde die Modellmischung unterschiedlich terminierter PEOs auf einer **Chromolith  $C_8$  (100 mm)** aufgetrennt. Die in Abb. 4.9 dargestellten Chromatogramme bestätigen, dass die Analysenzeiten auf diese Weise verkürzt werden können. Die stationäre Phase weist eine sehr hohe Bodenzahl auf, jedoch ist die Auflösung geringer als bei der Chromolith  $C_{18}$ .

Der Abfall der Trennleistung bei steigender Flussrate ist im vorliegenden Fall deutlich stärker als bei der Chromolith C<sub>18</sub>.

**Tab. 4.8** Einfluss der Flussrate auf die Trennleistung der Säule, stationäre Phase: Chromolith C<sub>8</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	20,5	30000	3,06
2	11,3	23300	2,86
3	7,9	17500	2,77
4	6,2	12200	2,52
5	5,3	10000	2,30
6	4,3	8800	2,22
7	3,9	7100	2,15



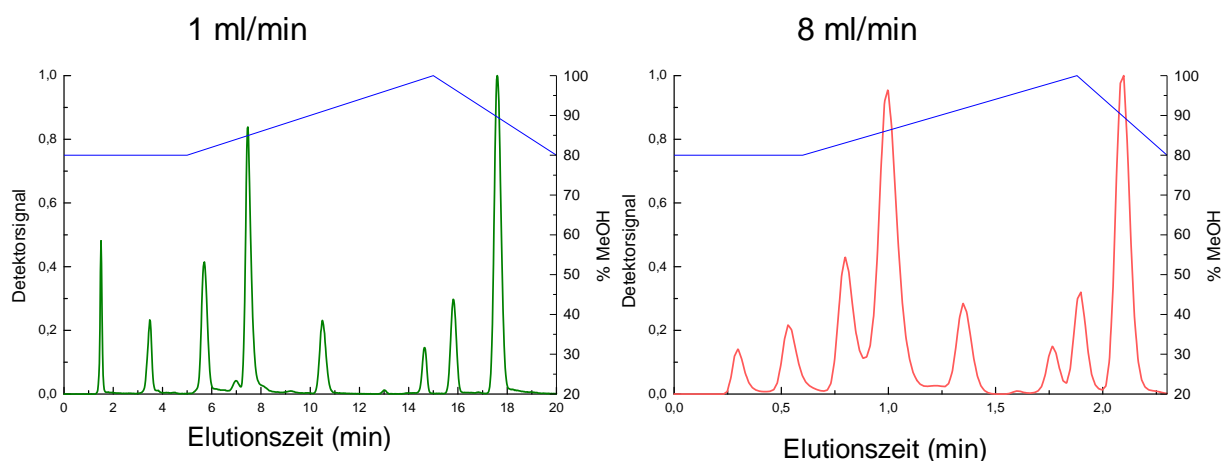
**Abb. 4.10** Van Deemter-Kurve für eine monolithische stationäre Phase, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>8</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v

Die Analysenzeit auf der C<sub>8</sub>-Säule ist deutlich kürzer als auf den beiden C<sub>18</sub>-Säulen. Dies ist erwartungsgemäß auf die geringeren hydrophoben Wechselwirkungen des Analyten mit dem Säulenmaterial zurückzuführen. Die minimale Analysenzeit beträgt auf der vorliegenden Säule etwa 4 min. Abb. 4.10 zeigt einen steileren Anstieg der van Deemter-Kurve für die C<sub>8</sub>-Säule im Vergleich zu beiden C<sub>18</sub>-Säulen (Abb. 4.6 und 4.8). Hieraus ergibt sich, dass bei höheren Flussraten die Trenneffizienz der C<sub>8</sub>-Säule geringer

ist als die der C<sub>18</sub>-Säule, die über einen breiteren Flussratenbereich effiziente Trennungen ermöglicht.

## 4.2 Gradientenmethoden

Der Wechsel von einem isokratischen auf ein Gradientenverfahren führt bei ausreichender Trennleistung häufig zu einer weiteren deutlichen Verkürzung der Messzeiten. In einem Lösungsmittelgradienten wird die Lösungsmittelstärke im Verlauf der Analyse geändert und damit die Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase variiert. Im vorliegenden Fall wird die Trennung zuerst unter kritischen Bedingungen durchgeführt. Dies führt zu einer guten Trennung für die PEOs mit kürzeren Endgruppen. Die PEOs mit längeren Endgruppen werden noch stark zurückgehalten. Ein linearer Gradient bis 100 % des thermodynamisch guten Lösungsmittels wird eingesetzt, um die Trennzeit für diese PEOs zu verkürzen. Abb. 4.11 zeigt repräsentativ die Trennungen auf der Chromolith C<sub>18</sub> (100 mm) bei einem linearen Gradienten und Flussraten von 1 und 8 ml/min.



**Abb. 4.11** Auftrennung von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen durch Gradienten-HPLC, stationäre Phase: Merck Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser, Probe: Modellmischung aus Tab. 4.1, Peakzuordnung wie in Abb. 4.2

Das Verhalten weiterer Säulen bei Anwendung eines Lösungsmittelgradienten ist in Tab. 4.9 - 4.13 zusammengefasst.



**Tab. 4.9** Einfluss des Gradienten bei unterschiedlichen Flussraten auf die Trennleistung der Säule, Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D.; Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	23,9	14000	4,12
2	12,2	10400	3,37
3	8,2	9000	3,27
4	6,3	8500	3,27
5	5,0	8000	3,43
6	4,2	7000	3,11
7	3,7	6700	3,24
8	3,1	5600	3,01

**Tab. 4.10** Einfluss des Gradienten bei unterschiedlichen Flussraten auf die Trennleistung der Säule, Chromolith C<sub>18</sub>, 50 x 4,6 mm I.D.; Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	12,6	14500	2,46
2	6,5	13900	2,54
3	4,5	10900	2,54
4	3,4	9800	2,44
5	2,7	7700	2,56
6	2,3	7500	2,35
7	2,0	5800	1,94
8	1,7	5900	2,28

**Tab. 4.11** Einfluss des Gradienten bei unterschiedlichen Flussraten auf die Trennleistung der Säule, Chromolith C<sub>8</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	12,1	18800	2,12
2	5,9	16100	2,18
3	3,9	13600	2,11
4	3,1	12100	2,03
5	2,5	10000	2,13
6	2,2	9000	1,85
7	1,8	7500	1,78
8	1,6	6600	1,63

**Tab. 4.12** Einfluss des Gradienten bei unterschiedlichen Flussraten auf die Trennleistung der Säule, Luna C<sub>18</sub>, 30 x 4,6 mm I.D., Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	15,1	19000	2,46
2	7,7	13000	2,29
3	5,1	16000	2,77

**Tab. 4.13** Einfluss des Gradienten bei unterschiedlichen Flussraten auf die Trennleistung der Säule, XTerra C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., Bestimmung von Auflösung und Bodenzahl wie in Tab. 4.3

Flussrate (ml/min)	Analysenzeit (min)	Bodenzahl (m <sup>-1</sup> )	Auflösung
1	10,8	16700	2,24
2	5,5	15200	2,27
3	3,9	12800	2,04

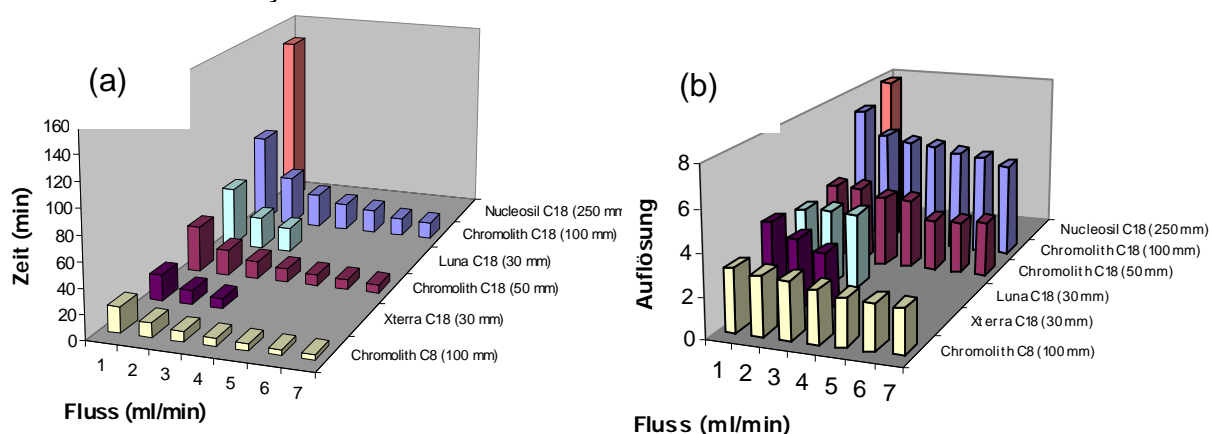
Die in Tab. 4.9 – 4.13 dargestellten Ergebnisse des Säulenscreenings zeigen, dass die Analysenzeit durch einen Gradienten reduziert werden kann. Ein Nachteil der Gradientenmethode ist jedoch, dass die Säule nach

jeder Analyse konditioniert werden muss (10 min bei 1 ml/min für die Chromolith C<sub>18</sub> (100 mm) Säule). Hierdurch wird die Analysenzeit (Tab. 4.10) bei einem Fluss von 1 ml/min auf ca. 25 min verlängert. Bei einem Fluss von 8 ml/min beträgt die Konditionierungszeit 1,5 min und damit die gesamte Analysenzeit 4 min.

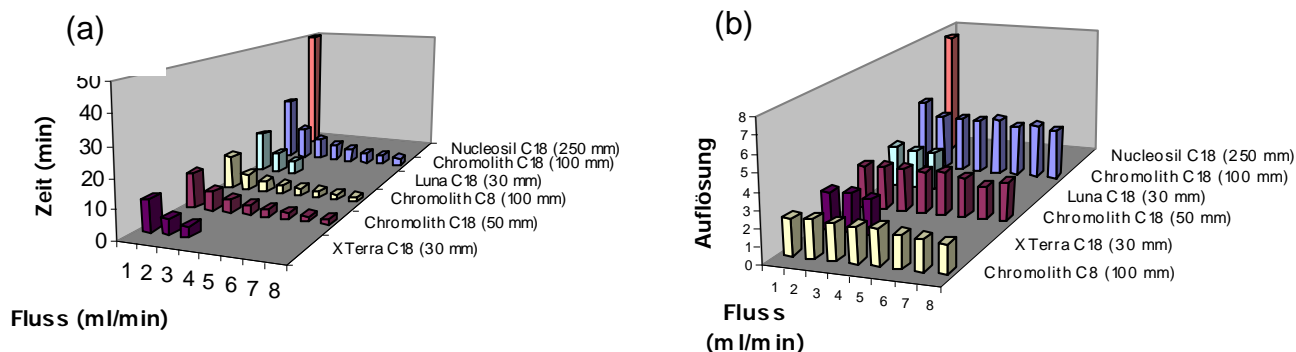
Die vorliegenden Ergebnisse haben unter Beweis gestellt, dass es möglich ist, durch Anwendung von monolithischen Säulen, einer Steigerung der Flussrate und die Verwendung eines Gradienten die Analysenzeit zu reduzieren. Durch geeignete Kombination dieser Maßnahmen kann die Analysenzeit einschließlich Konditionierung der Säule auf unter 2 min reduziert werden.

### 4.3 Vergleich von unterschiedlichen stationären Phasen

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die getesteten Säulen erheblich in Bezug auf Trennleistung und Zeitbedarf pro Messung unterscheiden. Obwohl es sich in fast allen Fällen um RP-18-Material handelt, wird sehr unterschiedliches chromatographisches Verhalten beobachtet. Dies wird auch in Abb. 4.11 deutlich, in der der Zeitbedarf der isokratischen Analysen bzw. die Auflösung für die unterschiedlichen Säulen verglichen werden. Abb. 4.12 zeigt den Zeitbedarf und die Auflösung für die Gradientenanalysen.



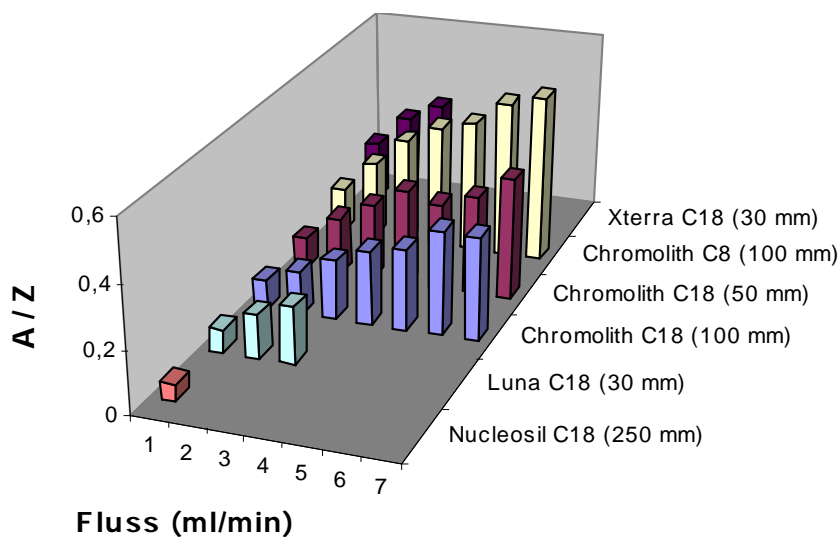
**Abb. 4.11** Säulenvergleich in Bezug auf (a) Analysenzeit und (b) Auflösung für isokratische Messungen



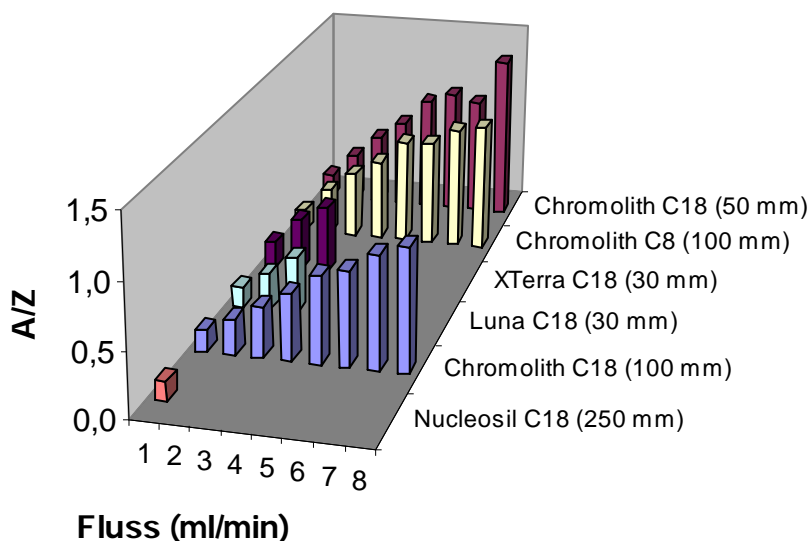
**Abb. 4.12** Säulenvergleich in Bezug auf (a) Analysenzeit und (b) Auflösung für Gradientenmessungen

Die Abbildungen zeigen, dass sowohl bei isokratischen als auch bei Gradientenanalysen die Nucleosil C<sub>18</sub>-Säule die beste Auflösung besitzt. Diese hat aber auch die längste Analysenzeit. Die Säule mit der zweitbesten Auflösung ist die 100 mm-Chromolith C<sub>18</sub>-Säule, die jedoch eine deutliche Abnahme der Auflösung bei einer Erhöhung des Flusses von 1 auf 2 ml/min zeigt. Gleichzeitig ist die Messzeit für diese Säule relativ hoch. Die 50 mm-Chromolith C<sub>18</sub>-, Luna- und XTerra-Säulen haben vergleichbare Auflösungen bei einem Fluss von 1-2 ml/min. Erst bei Flussraten oberhalb von 5 ml/min nimmt bei der 50-mm-Chromolith C<sub>18</sub>-Säule die Auflösung signifikant ab. Die 100 mm-Chromolith C<sub>8</sub>-Säule zeigt eine relativ geringe Auflösung, die jedoch auch bei zunehmendem Fluss vergleichsweise konstant ist. Sie weist die kürzeste Analysenzeit aller Säulen auf.

Eine Möglichkeit, die Leistung einer Säule objektiv zu bewerten, ist die Betrachtung des Quotienten aus Auflösung und Analysenzeit,  $A/Z$ . In Abb. 4.13 und 4.14 ist deutlich zu erkennen, dass die Nucleosil-Säule die schlechtesten Ergebnisse liefert. Die besten Werte liefert die Chromolith C<sub>8</sub>-Säule.



**Abb. 4.13** Säulenvergleich in Bezug auf den Quotienten aus Auflösung und Analysenzeit für isokratische Messungen.



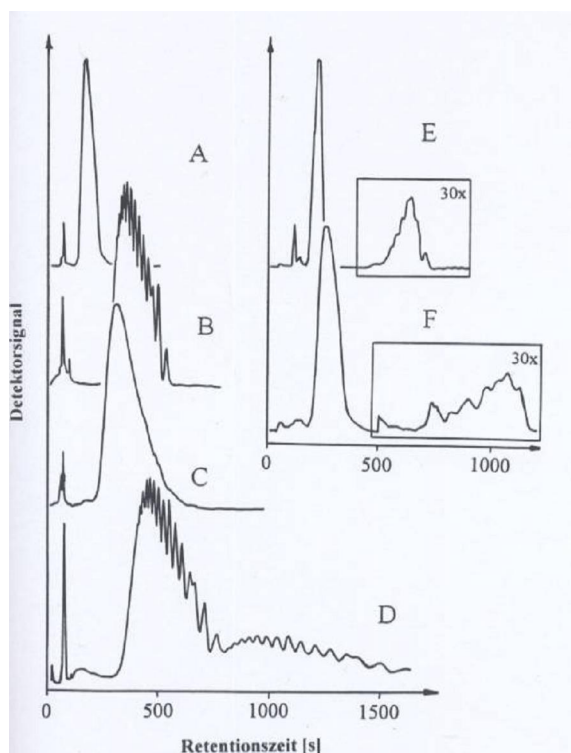
**Abb. 4.14** Säulenvergleich in Bezug auf den Quotienten aus Auflösung und Analysenzeit für Gradientenmessungen

Für die gewählte Trennung der PEO-Modellmischung unter isokratischen Bedingungen zeigt die Chromolith C<sub>8</sub>-Säule (100 mm) die beste Auflösung pro Zeiteinheit. Für die entsprechende Gradiententrennung liefert die Chromolith C<sub>18</sub>-Säule (50 mm) die besten Ergebnisse. Generell ist festzustellen, dass die Wahl der geeignetsten Säule ein Kompromiss zwischen Analysenzeit einerseits und Auflösung andererseits ist.

## 5 Schnelle Adsorptionschromatographie (LAC) von Polyethylenoxiden

Wie bereits beschrieben ist es möglich, Polyethylenoxide mittels LC-CC nach der Art der Endgruppen aufzutrennen. Derartige Trennungen werden typischerweise auf einer Umkehrphase RP-18 und einer mobilen Phase aus Acetonitril-Wasser oder Methanol-Wasser erreicht. Unter LC-CC-Bedingungen erfolgt die Trennung unabhängig vom Ethoxylierungsgrad ausschließlich nach den Endgruppen. Aus der Literatur ist bekannt, dass RP-18 Phasen zwei kritische Punkte für PEG aufweisen können<sup>100</sup>. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Wechselwirkung mit unterschiedlichen Oberflächenkomponenten der stationären Phase. Trathnigg et al. spekulieren, dass bei geringerer Polarität der mobilen Phase die Wechselwirkung der EO-Gruppen mit den Silanolgruppen überwiegt, beim zweiten kritischen Punkt (höhere Polarität der mobilen Phase) dagegen die Wechselwirkung der Endgruppen mit den C<sub>18</sub>-Gruppen bestimmend ist. Die Autoren konnten zeigen, dass für PEG auf einer Prodigy-ODS3-Säule kritische Bedingungen für PEG in Aceton-Wasser bei 28 bzw. 95 % Aceton herrschen. Es gelang ihnen, auf dieser Säule bei einem Acetongehalt von 86 % Dodecansäurepolyglycolester nach dem EO-Gehalt (Oligomerisierungsgrad) aufzutrennen<sup>101-104</sup>.

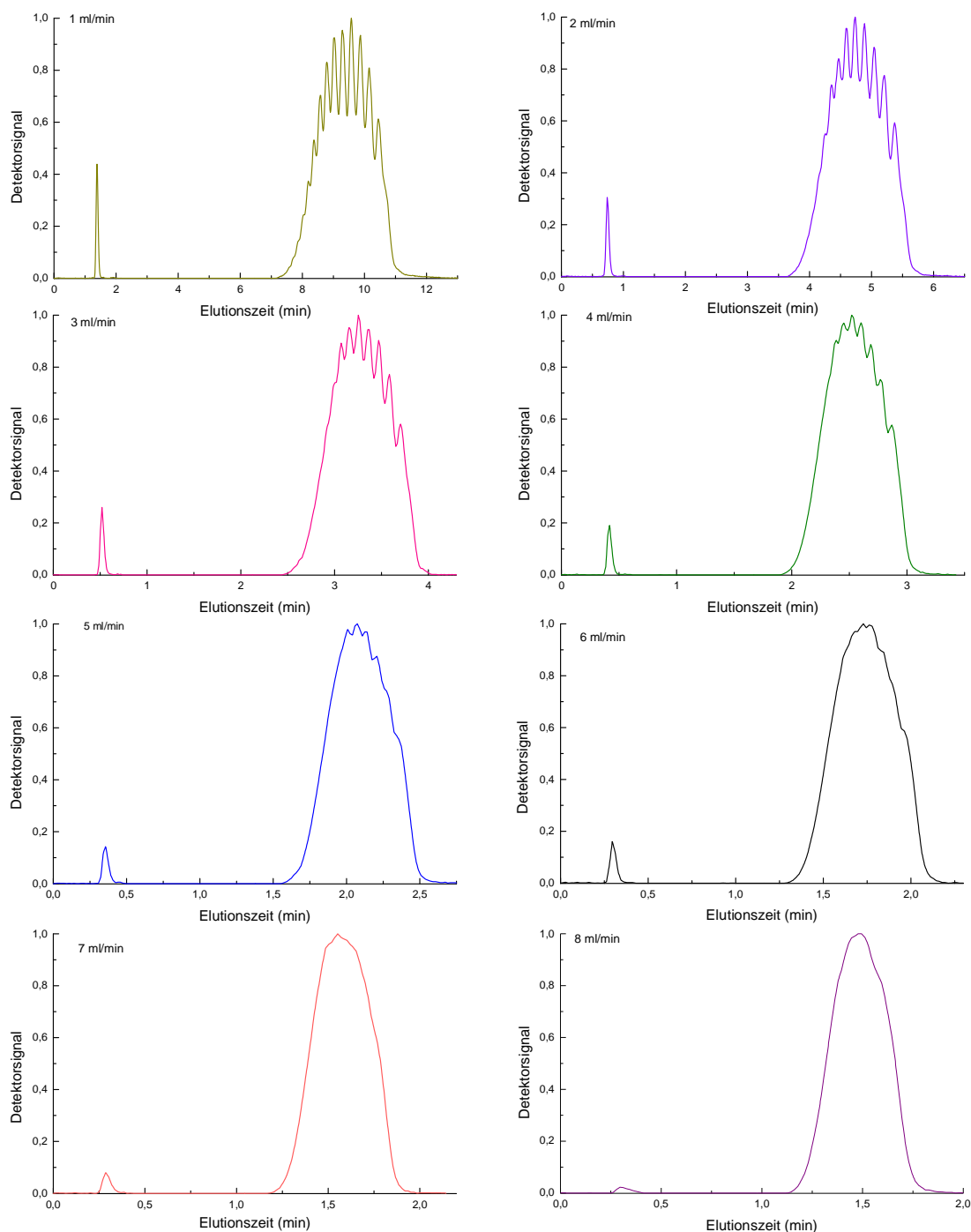
Nach Henze et al. liegt der kritische Punkt für PEG auf einer RP-18 Phase mit Acetonitril/Wasser als mobiler Phase bei ungefähr 45 % Acetonitril. Wenn der Acetonitrilanteil auf 70 % erhöht wird ist es möglich, durch einen modifizierten SEC-Modus eine Oligomertrennung für C<sub>12</sub>- und C<sub>13</sub>/C<sub>15</sub>-terminierte PEGs zu erreichen<sup>106</sup> (Abb. 5.1). Wie durch Analyse der einzelnen Fraktionen mittels MALDI-ToF-MS gezeigt wurde, eluieren bei diesem Modus Probenkomponenten mit einem höheren Oligomerisierungsgrad vor kürzeren Ketten. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch Bestimmung des Oligomerisierungsgrades via LC-NMR-Kopplung<sup>107</sup> bestätigt.



**Abb. 5.1** Auftrennung von PEGs mit unterschiedlichen Endgruppen durch modifizierten SEC-Modus, stationäre Phase: M&N Nucleosil C<sub>18</sub>, 125 x 4 mm I.D., mobile Phase: Acetonitril-Wasser 70:30 v/v, Probe: (A) C<sub>10</sub>-PEG, (B) C<sub>12</sub>-PEG, (C) C<sub>13</sub>-PEG, (D) C<sub>13</sub>/C<sub>15</sub>-PEG, (E) Octylphenol-PEG, (F) Nonylphenyl-PEG<sup>106</sup>

## 5.1 RP-Chromatographie in Acetonitril-Wasser

Ziel des folgenden Abschnittes ist es, den beschriebenen Trennmodus für C<sub>12</sub>-PEG auf einer C<sub>18</sub>-modifizierten Chromolith-Säule in Acetonitril/Wasser durchzuführen und auf hohe Flussraten zu übertragen. Dabei sind die Auflösung und Trennleistung in Abhängigkeit von der Flussrate zu ermitteln. Dazu müssen zunächst die geeigneten chromatographischen Bedingungen für die Chromolith-Säule ermittelt werden. Bei einer Lösungsmittelzusammensetzung von Acetonitril-Wasser 60:40 v/v wurde eine Elution im modifizierten SEC-Modus erreicht. Abb. 5.2 zeigt die erreichte Oligomerentrennung von C<sub>12</sub>-PEG bei unterschiedlichen Flussraten.



**Abb. 5.2** Auftrennung von C<sub>12</sub>-PEG durch modifizierten SEC-Modus bei unterschiedlichen Flussraten, stationäre Phase: Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Acetonitril-Wasser 60:40 v/v

Bei einer Flussrate von 1 ml/min können 10 Oligomere deutlich erkannt werden. Die zuerst eluierenden Peaks haben einen höheren Oligomerisierungsgrad als später eluierende Peaks, da die Trennung im modifizierten SEC-Modus erfolgt. Der Peak bei ca. 1,5 ml entspricht PEG,

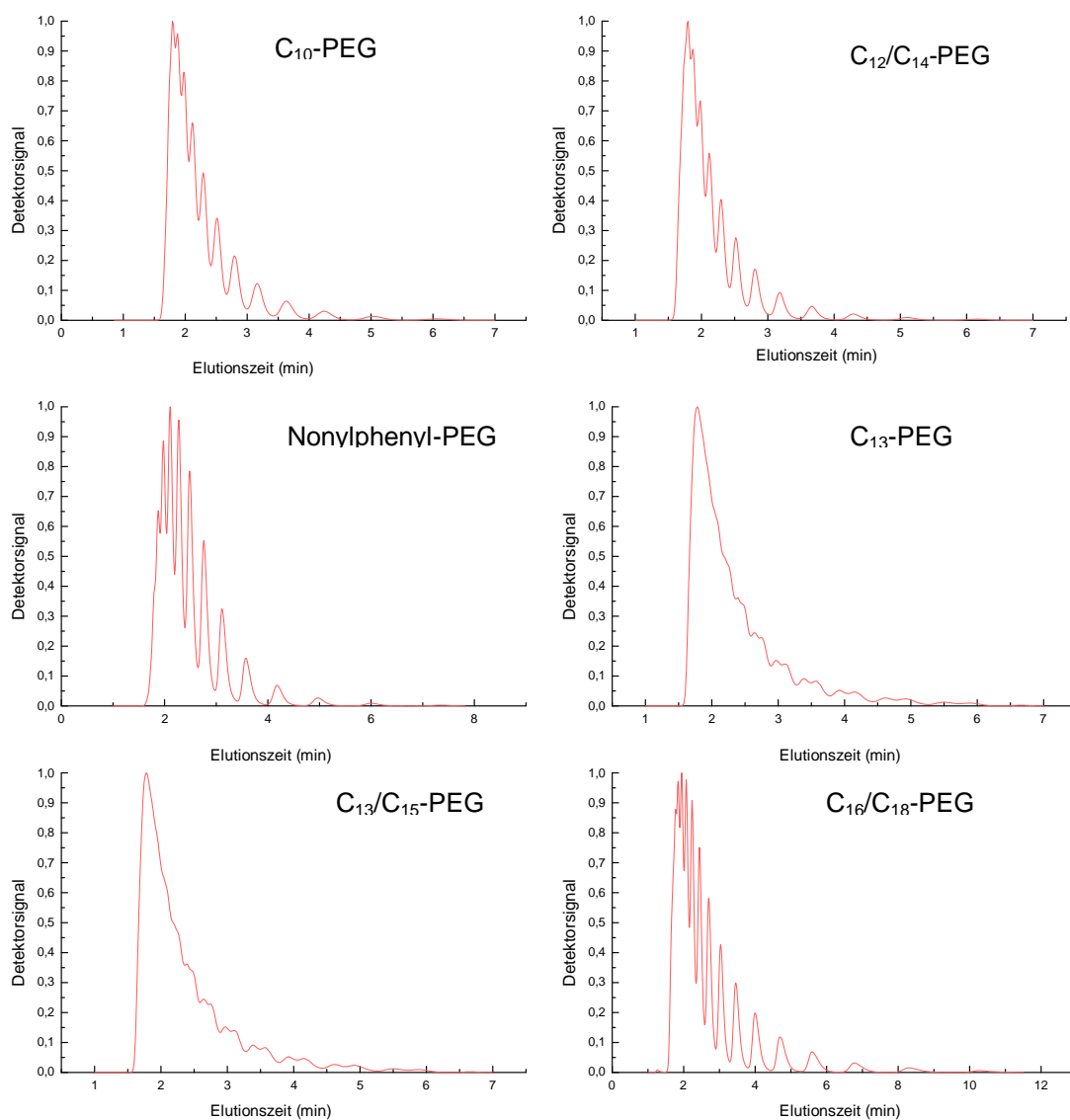


das meistens als Verunreinigung in den Polyethylenoxiden auftritt. Deutlich zu erkennen ist ein Verlust an Trennleistung mit zunehmender Flussrate. Während bei niedrigen Flussraten einzelne Oligomere gut zu erkennen sind, ist ab 7 ml/min nur noch ein Peak zu sehen. Damit ist die Möglichkeit der Oligomertrennung mit zunehmendem Fluss nicht mehr gegeben. Dieser Verlust an Auftrennung ist auf das van Deemter-Verhalten (Abb. 4.6) der stationären Phase zurückzuführen. Aus der van Deemter-Kurve dieser Säule geht hervor, dass  $1/N$  bis zu einer Flussrate von 3 ml/min relativ konstant bleibt und ab 4 ml/min ständig ansteigt. Mit der Zunahme von  $1/N$  nimmt die Trennleistung ab, was eine geringere Auflösung zur Folge hat. Bei hohen Flussgeschwindigkeiten ist eine vollständige Gleichgewichtseinstellung zwischen stationärer und mobiler Phase nicht mehr zu gewährleisten. Dieser Zusammenhang ist im C-Term der van Deemter-Gleichung beschrieben, aus welchem folgt, dass die Trennleistung mit zunehmendem Fluss abnimmt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Trennung bei 1 ml/min mit einer sehr guten Auflösung in 12 min durchzuführen ist. Die Flussrate kann auf bis zu 8 ml/min erhöht werden, so dass die Trennzeit nur noch 2 min beträgt. Bei Flussraten ab 4 ml/min ist jedoch die Auflösung nicht mehr ausreichend, um die Oligomere aufzutrennen. Somit ergibt sich als minimale Analysendauer eine Zeit von 4 min bei einer Flussrate von 3 ml/min.

## 5.2 NP-Chromatographie in Isopropanol-Wasser

Wie Henze<sup>106</sup> gezeigt hat, ist es möglich,  $C_{12}$ -PEG mittels RP-Chromatographie nach dem Oligomerisierungsgrad zu trennen (Abb. 5.1). Dies ist bisher auch für  $C_{13}/C_{15}$ -endgruppenmodifizierte PEGs gelungen. Trathnigg et al.<sup>108</sup> beschreiben die Auftrennung von PEG nach EO-Gehalt mittels NP-Chromatographie. Die Autoren trennten  $C_{12}$ -PEG auf einer NP-Phase mit einer mobilen Phase aus Isopropanol-Wasser in die Oligomeren. Einen Überblick über die Trennung von PEOs nach dem Ethoxylierungsgrad an partikulären Phasen gibt Rissler<sup>109</sup>. Er beschreibt Trennungen bis zum Oligomerisierungsgrad  $n = 60$ .

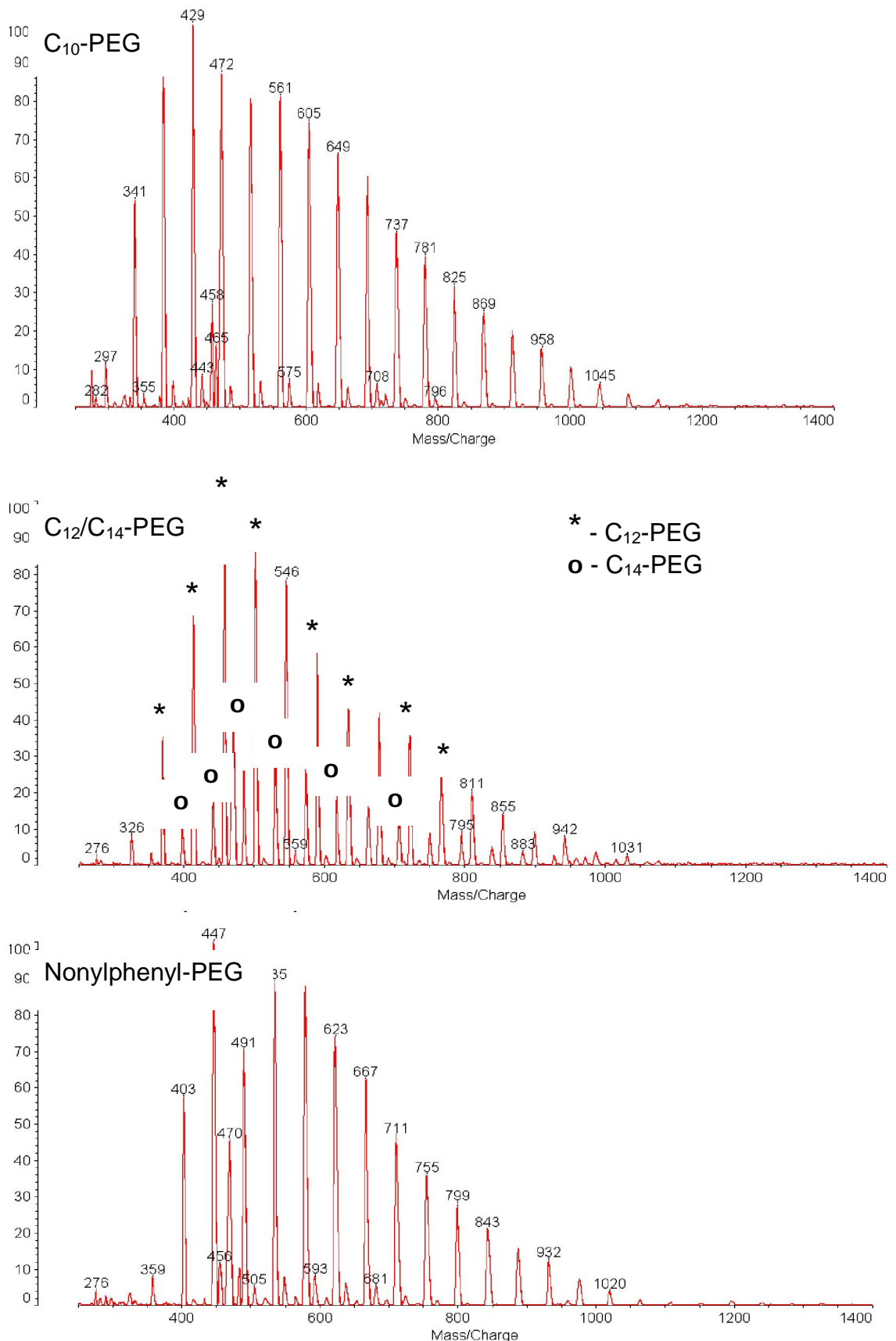
Mit dem Ziel einer Verkürzung der Analysenzeit wurde die Trennung unterschiedlich terminierter PEGs auf einer monolithischen Normalphase auf der Basis von Silicagel durchgeführt. Die Chromatogramme sind in Abb. 5.3 gezeigt. Auf diesem Weg kann ohne Einfluss der Endgruppen nach dem Oligomerisierungsgrad getrennt werden.

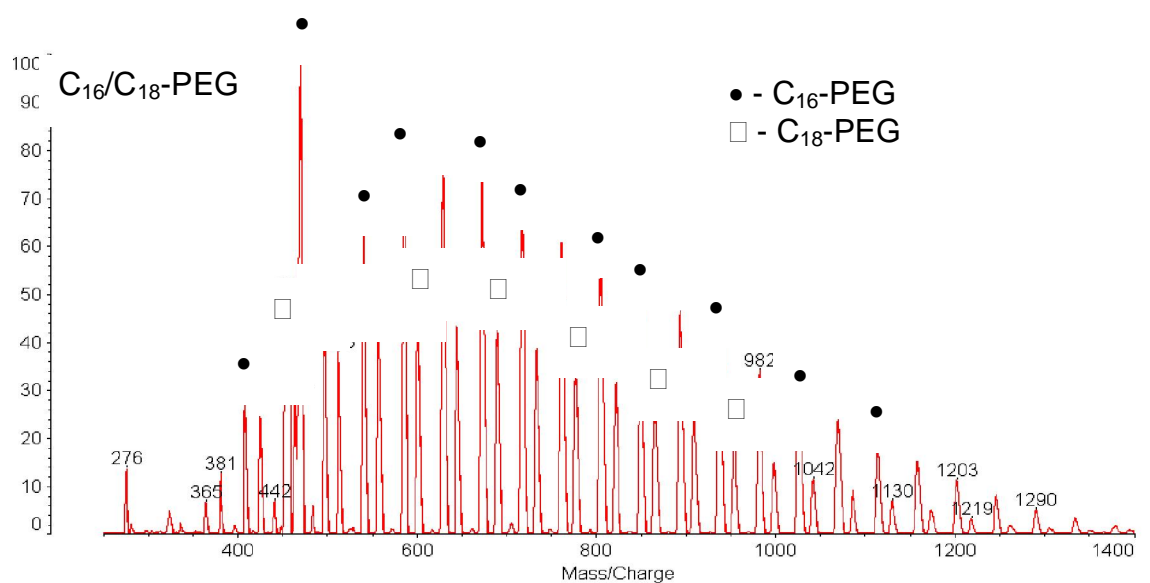
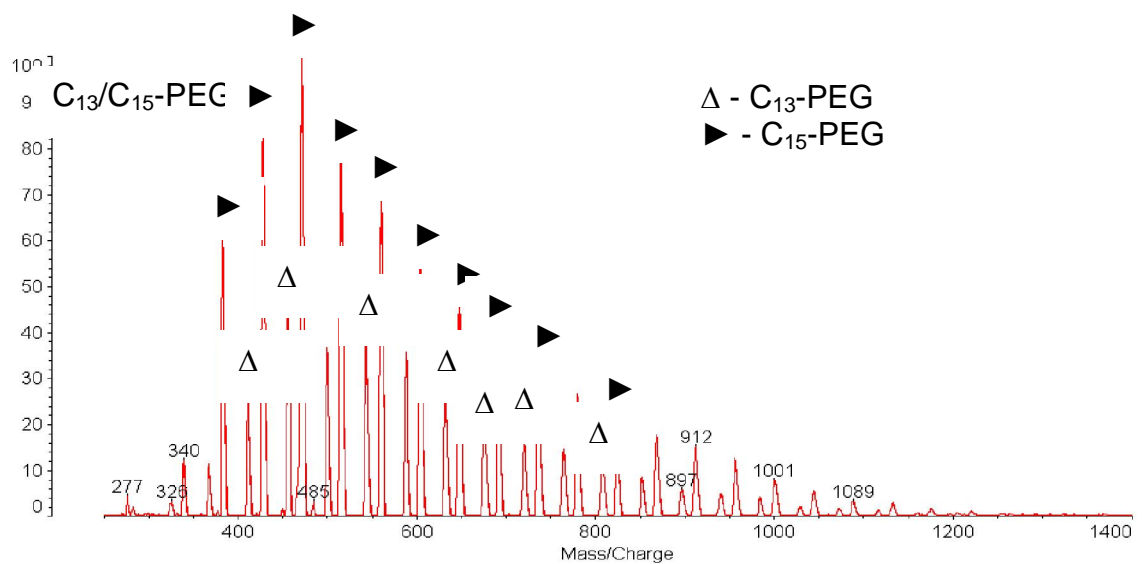
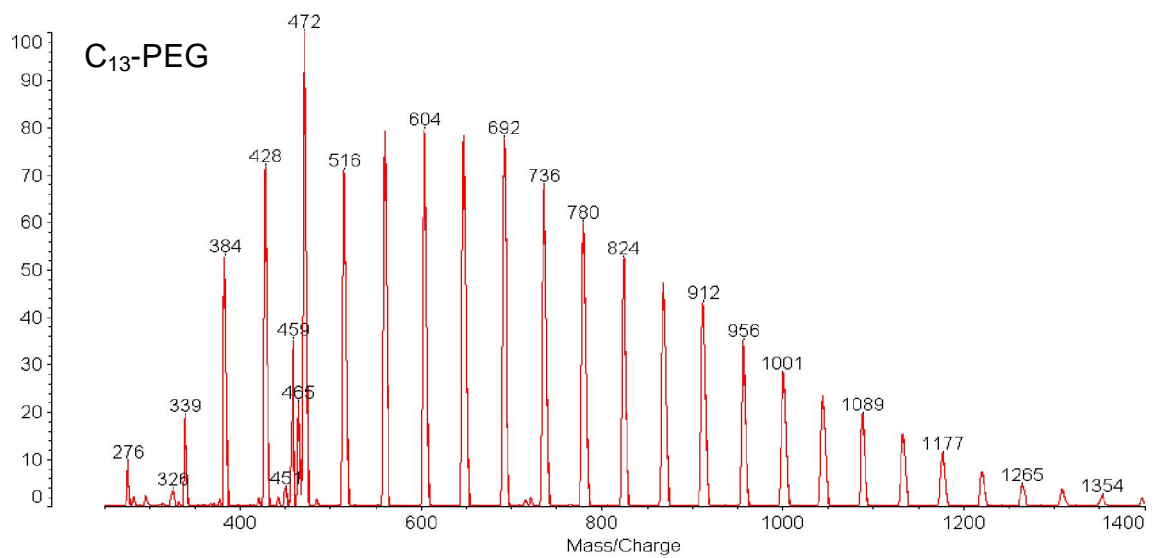


**Abb. 5.3** Auftrennung von PEOs mit verschiedenen Endgruppen durch NP-LC, stationäre Phase: Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Isopropanol-Wasser 88:12 v/v, Flussrate 1 ml/min

Man kann erkennen, dass bei binären Endgruppengemischen (Abb. 5.3 C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>- und C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub>-PEG) jeweils nur ein einziger Peak für das jeweilige Oligomere zu beobachten ist. In zwei Fällen (C<sub>13</sub>- und C<sub>13</sub>/C<sub>15</sub>-PEG) ist kaum eine chromatographische Oligomeraufspaltung zu erkennen. Um die

sich daraus ergebende Vermutung, dass die Endgruppe keinen Einfluss auf die Trennung hat, zu verifizieren, wurden die Gesamtproben mit MALDI-ToF-MS vermessen (Abb. 5.4). Sowohl die Endgruppenverteilung als auch die Molmasse jeder Endgruppe bzw. Endgruppenmischung lassen sich so bestimmen.

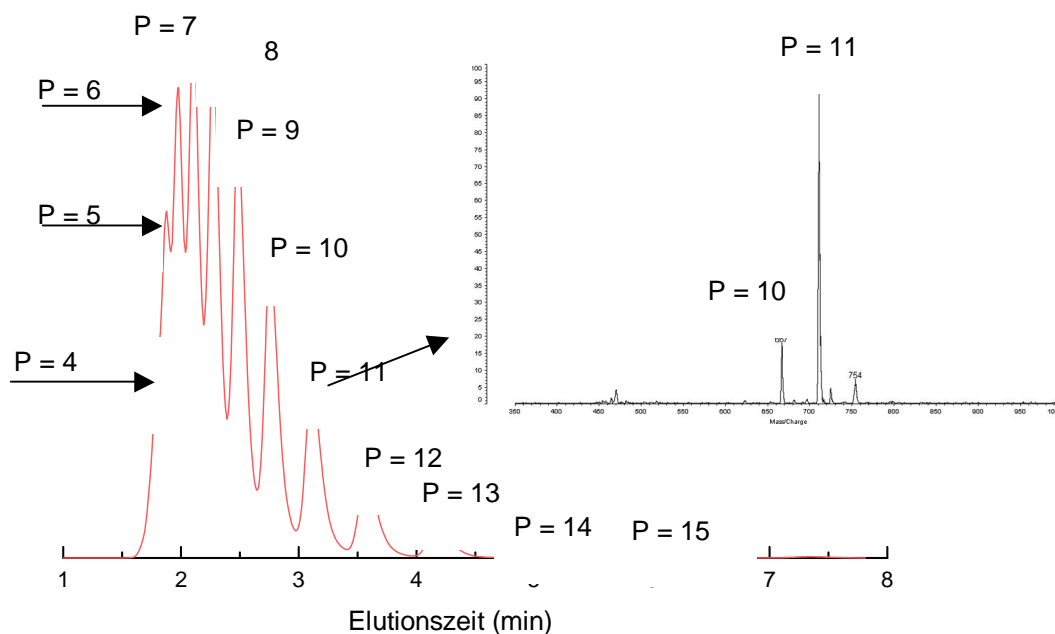




**Abb. 5.4** MALDI-ToF-MS von PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen

Alle Proben weisen eine Verteilung mit einem Abstand  $\Delta m/z$  von 44 Da zwischen den Signalen auf. Zusätzlich beobachtet man bei den Proben  $C_{12}/C_{14}$ -,  $C_{13}/C_{15}$ - und  $C_{16}/C_{18}$ -PEG zwei Verteilungen, die gegeneinander verschoben sind. Der Unterschied  $\Delta m/z$  zwischen zwei Peaks beträgt 28 Da und entspricht zwei  $-CH_2-$  Einheiten. Die Peakserie mit der größeren Intensität entspricht in jedem Fall der kleineren Endgruppe. So gehören beispielsweise bei der  $C_{12}/C_{14}$ -PEG-Probe die Peaks, die mit \* markiert sind, zur  $C_{12}$ -Endgruppe, die mit o indizierten zur  $C_{14}$ -Endgruppe (Abb 5.4.b). Die Serien der  $C_{13}/C_{15}$ - und  $C_{16}/C_{18}$ -PEG sind analog markiert. Da somit alle Proben, die gemischte Endgruppen enthalten, mehrfache Verteilungen zeigen, bestätigt sich die Vermutung, dass die Endgruppen keinen Einfluss auf die chromatographische Trennung haben, weil sich diese im Chromatogramm nicht manifestieren. Eine absolute Peakzuordnung der Oligomere im Chromatogramm ist aber auch durch einen Vergleich von Abb. 5.3 und 5.4 nicht möglich, da die Chromatogramme weniger Oligomerpeaks aufweisen als die MALDI-ToF-Spektren. So sind z.B. für  $C_{10}$ -PEG aus der Chromatographie maximal 12 Oligomerpeaks erkennbar, während das MALDI-ToF-Spektrum bis zu 19 Peaks aufweist. Eine Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass nieder- und höhermolekulare Anteile in der Chromatographie nicht mehr aufgelöst werden oder eine Überlagerung verschiedener Oligomere erfolgt.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen und eine genaue Zuordnung des Oligomerisierungsgrades für jeden Peak zu erreichen, ist die Kombination aus LC-NMR und LC-MALDI-ToF-MS. Beim *stop-flow* Ansatz der LC-NMR-Kopplung wird das Eluat in Probenschleifen gesammelt und anschließend mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Parallel dazu wird nach dem gleichen Prinzip für die MALDI-ToF-Spektrometrie fraktioniert. Abb. 5.5 zeigt das Chromatogramm für Nonylphenyl-PEG und exemplarisch das MALDI-ToF-MS für den Oligomerisierungsgrad  $P = 11$ . Die mittels MALDI-ToF-MS berechneten Oligomerisierungsgrade sind eingezeichnet.

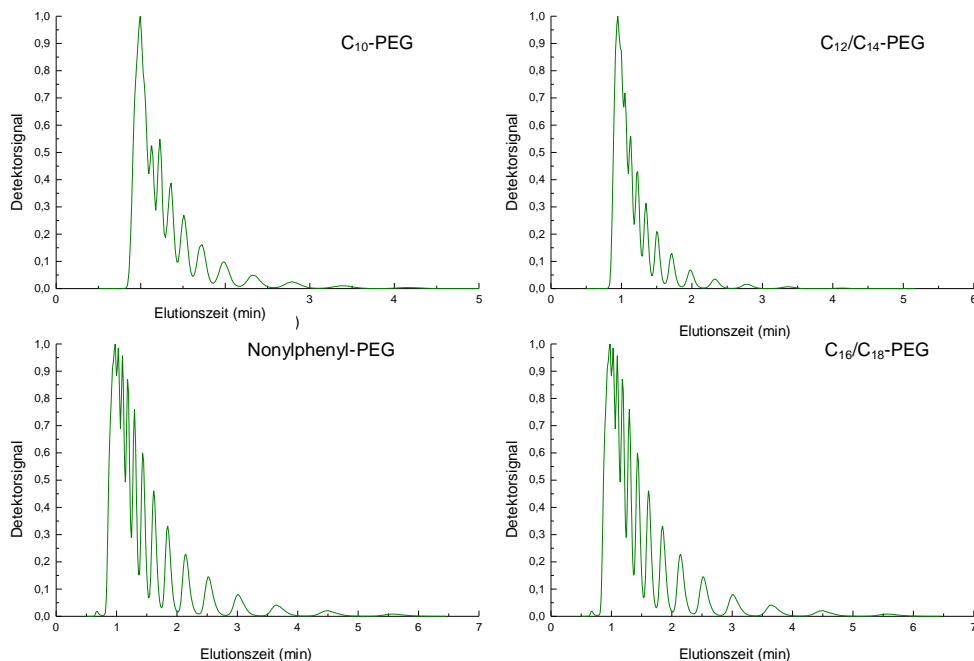


**Abb. 5.5** Auftrennung von Nonylphenyl-PEG durch NP-LC, stationäre Phase: Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Isopropanol-Wasser 88:12 v/v, Flussrate 1 ml/min

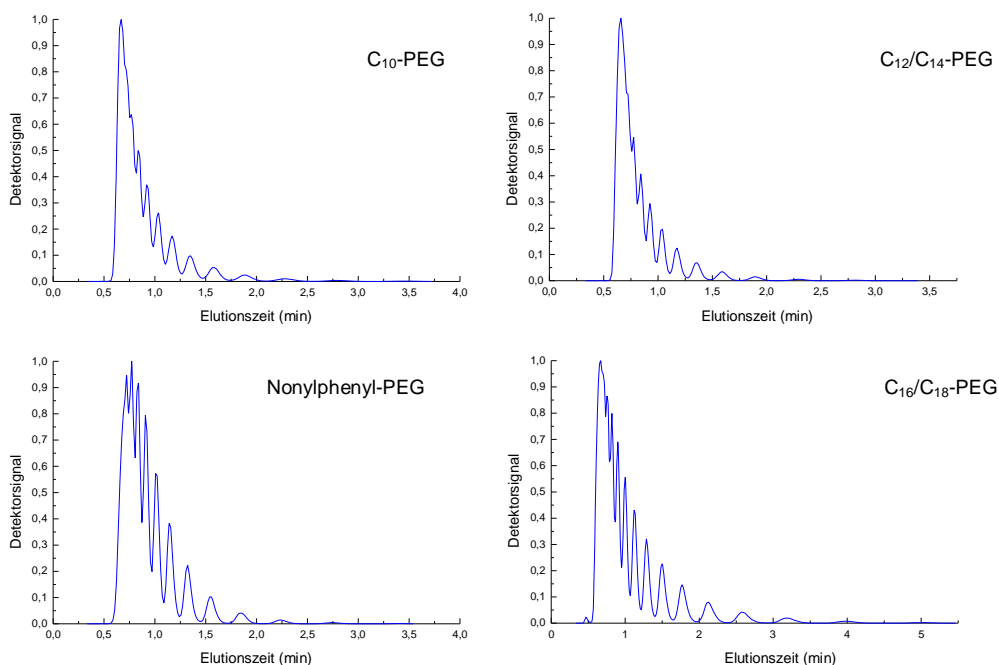
Da die Peaks im Chromatogramm nicht basisliniengetrennt sind, zeigt das MALDI-ToF-Spektrum Signale für die Oligomerisierungsgrade 10 und 11, die aber aus dem Verhältnis der Integrale der Resonanzen der  $-O-CH_2-$  und  $-C_6H_5-$  Gruppen im NMR-Spektrum dem Oligomerisierungsgrad 11 zugeordnet werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Peaks bei kleineren Volumina (ca. 2 ml) den niedrigeren Oligomerisierungsgrad aufweisen. Mit zunehmendem Elutionsvolumen nimmt die Anzahl der EO-Einheiten zu. Dies korreliert mit der Annahme, dass auf der polaren Säule das polarste Oligomer am stärksten adsorbiert wird. Eine Überlagerung aller Elugramme ( $C_{10^-}$ ,  $C_{12}/C_{14^-}$ , Nonylphenyl,  $C_{13}/C_{15^-}$  und  $C_{16}/C_{18-PEG}$ ) beweist, dass die Elutionszeit der einzelnen Peaks bei allen Proben übereinstimmt und es damit möglich ist, den Oligomerisierungsgrad der Peaks den anderen Proben zuzuordnen.

Nach der erfolgreichen Peakzuordnung kann nun der Einfluss der Flussrate auf die Auflösung untersucht werden. Dazu wurden  $C_{10^-}$ ,  $C_{12}/C_{14^-}$ ,

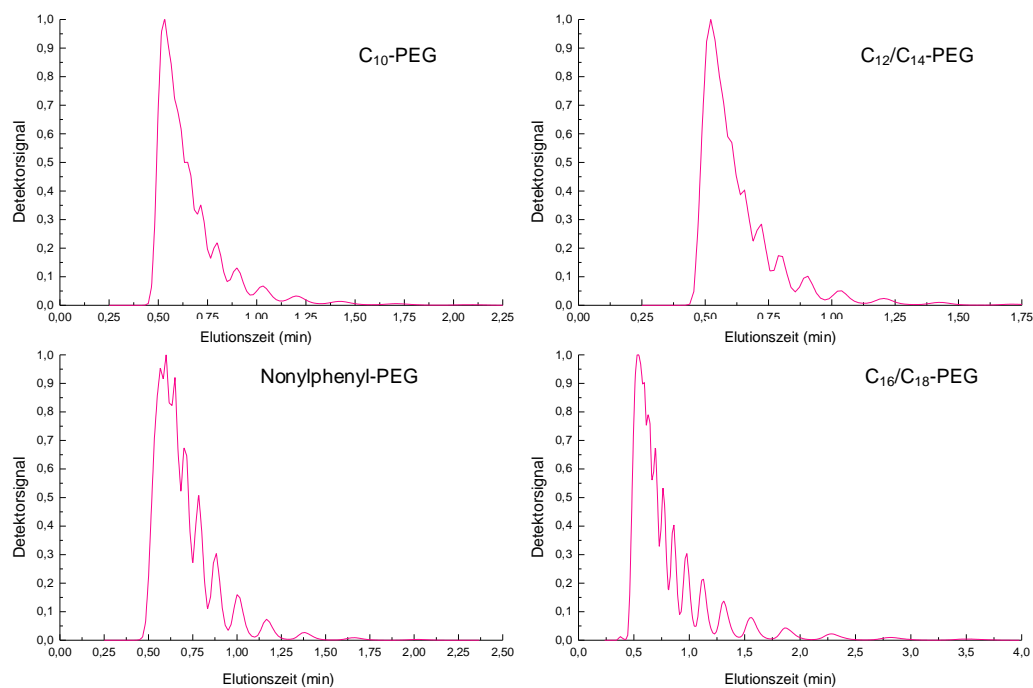
Nonylphenyl- und C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub>-PEG bei unterschiedlichen Flussraten vermessen.  
Die Ergebnisse sind in Abb. 5.6 - 5.8 zusammengestellt.



**Abb. 5.6** Auftrennung von PEO mit unterschiedlichen Endgruppen durch NP-LC, stationäre Phase: Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Isopropanol-Wasser 88:12 v/v, Flussrate 2 ml/min



**Abb. 5.7** Auftrennung von PEO mit unterschiedlichen Endgruppen durch NP-LC, stationäre Phase: Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Isopropanol-Wasser 88:12 v/v, Flussrate 3 ml/min



**Abb. 5.8** Auftrennung von PEO mit unterschiedlichen Endgruppen durch NP-LC, stationäre Phase: Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Isopropanol-Wasser 88:12 v/v, Flussrate 4 ml/min

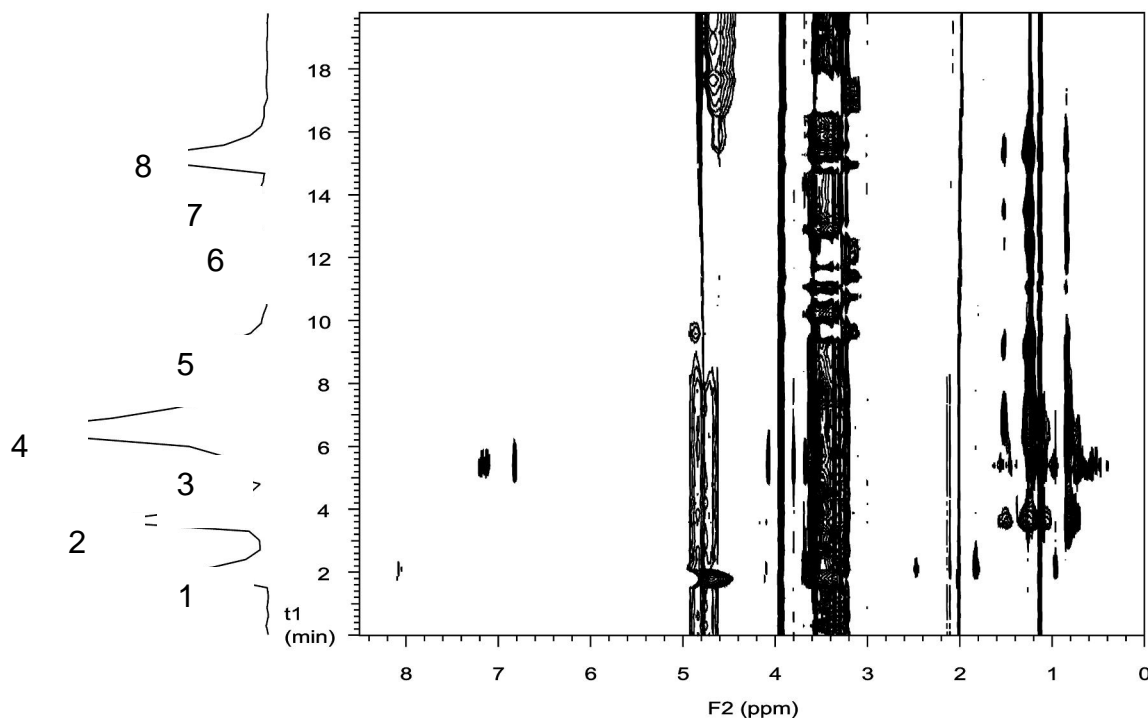
Bei einer Flussrate von 1 ml/min ist es möglich, die Oligomere in 12 min zu trennen. Wie in Abb. 5.8 zu erkennen ist es auch möglich, die Oligomertrennung bei einer erhöhte Flussrate von 4 ml/min in 3,5 min durchzuführen. Da aufgrund des Lösungsmittelgemisches von Isopropanol/Wasser ein sehr hoher Gegendruck entstand, war es jedoch nicht möglich, die Flussrate weiter zu erhöhen. Generell ist eine Abnahme der Auflösung mit zunehmendem Fluss zu erkennen. Der Auflösungsverlust ist für die kurzkettig terminierten C<sub>10</sub>- und C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>-PEG größer als für die C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub>-PEG.

### 5.3 LC-NMR-Kopplung

Während die Chromatographie unter optimalen Bedingungen eine Auftrennung in die einzelnen Komponenten gestattet, ist anhand der Retentionszeit bzw. des Detektorsignals in der Regel keine Aussage zur chemischen Struktur der Komponente möglich. Dies gelingt durch Kopplung der chromatographischen Trennung mit einer strukturselektiven Detektionsmethode wie der FTIR- oder NMR-Spektroskopie bzw. der Massenspektrometrie. Bei einer LC-NMR-Kopplung wird das gesamte Eluat

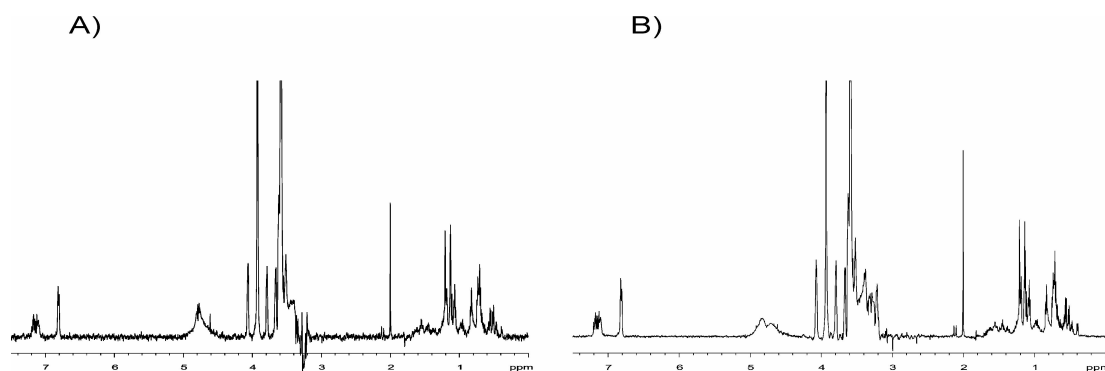


aus der Chromatographie in den Probenkopf des NMR-Spektrometers überführt und vermessen. Als Ergebnis kann eine eindeutige Zuordnung einzelner Peaks im Chromatogramm zu bestimmten Protonen erreicht werden. Die genaue experimentelle Vorgehensweise ist in der Literatur beschrieben<sup>110</sup>. Die Lösungsmittelunterdrückung wurde mittels der WET-Technik<sup>111</sup> durchgeführt. Aufgrund der Verwendung von protoniertem MeOH und D<sub>2</sub>O müssen sowohl die Signale der  $-\text{CH}_3$ -Gruppe (3,4 ppm) als auch der  $-\text{OH}$ -Gruppe (4,7 – 4,9 ppm) des Methanols und bei steigendem LC-Gradienten die  $\text{HDO}$ -Signale des Wassers unterdrückt werden. Insbesondere muss die  $-\text{CH}_3$ -Gruppe mit einem sehr selektiven Puls unterdrückt werden, um die  $-\text{OCH}_2$ -Gruppen der Ethoxylat-Gruppen nicht zu beeinflussen. Aus diesem Grunde ist es auch notwendig, die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten der  $-\text{CH}_3$ -Gruppen sehr selektiv zu unterdrücken. Dies wird erreicht durch eine gleichzeitige Entkopplung der  $^{13}\text{C}$ -Resonanz während des geformten Pulses. Abb. 5.9 zeigt das Konturdiagramm der LC-NMR-Messung der Modellmischung.



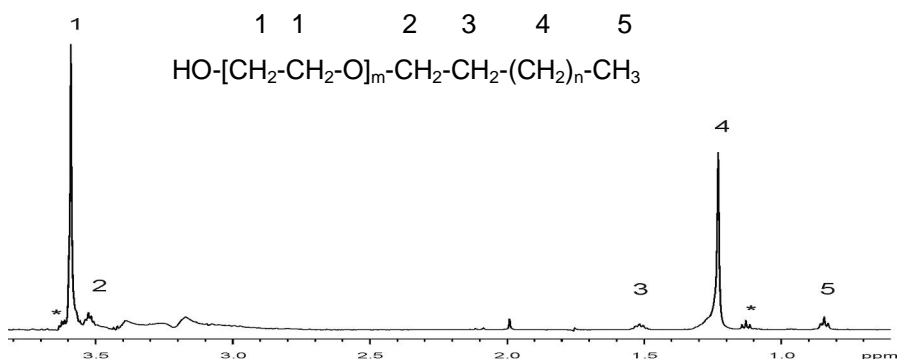
**Abb. 5.9** LC-CC-NMR-Analyse der PEO-Modellmischung aus Tab. 4.1, stationäre Phase: Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/D<sub>2</sub>O 80:20 v/v, Flussrate 1 ml/min

Die Projektion des Konturdiagramms auf die Ordinate spiegelt das mit dem ELSD erhaltene Chromatogramm (Abb. 4.10) wider, während die Abszisse die chemische Verschiebung der Protonen zeigt. Bei dieser Messung war es nicht möglich, alle Signale der Endgruppen zu quantifizieren, da das Signal-Rausch-Verhältnis zu niedrig war. Mittels eines Cryo-Probenkopfes jedoch wird die Empfindlichkeit verbessert. Unter Cryo-Bedingungen der NMR-Sonde ist es dann möglich, jeden chromatographischen Peak einer Endgruppe zuzuordnen. Bei herkömmlichen Probenköpfen befindet sich die Messspule bei Raumtemperatur während diese im Falle des Cryo-Kopfes isoliert ist und auf 20 K gekühlt wird. Durch das Kühlen mit dem Cryo-Gas Helium wird das Rauschen des NMR-Signals drastisch reduziert und es kommt zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses bis zu einem Faktor von 4 (Abb. 5.10).



**Abb. 5.10** NMR-Spektren des Nonylphenol-PEG; (A) normale Bedingungen, (B) Cryo-Bedingungen

Abb. 5.11 zeigt das 1D-WET-Spektrum des C<sub>18</sub>-PEG und die Zuordnung der zur Endgruppenbestimmung verwendeten Signale.



**Abb. 5.11** 1D-WET-Spektrum des C<sub>18</sub>-PEG im stop-flow-Modus

Die Kettenlänge der Endgruppen wurde über das Verhältnis der Integrale der  $\text{CH}_2$ - (Signale 4 und 3 bei 1.22 und 1.52 ppm) und  $\text{CH}_3$ -Resonanzen (Signal 5 bei 0.84 ppm) bestimmt. Unter der Annahme einer linearen Endgruppe wurde im vorliegenden Fall wurde die Kettenlänge durch  $n = I_4/I_3$  oder  $n = 3I_4/2I_5$  berechnet. Hier ist  $n$  die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Kette und  $I_x$  sind die Zuordnungen der betreffenden Resonanzen wie in Abb. 5.11 eingezeichnet. Tab. 5.1 gibt die Elutionsvolumina und die berechneten Endgruppen wider.

**Tab. 5.1** Elutionszeit und mittels NMR-Kopplung erzielte Zuordnung der Peaks im Elugramm der Modellmischung.

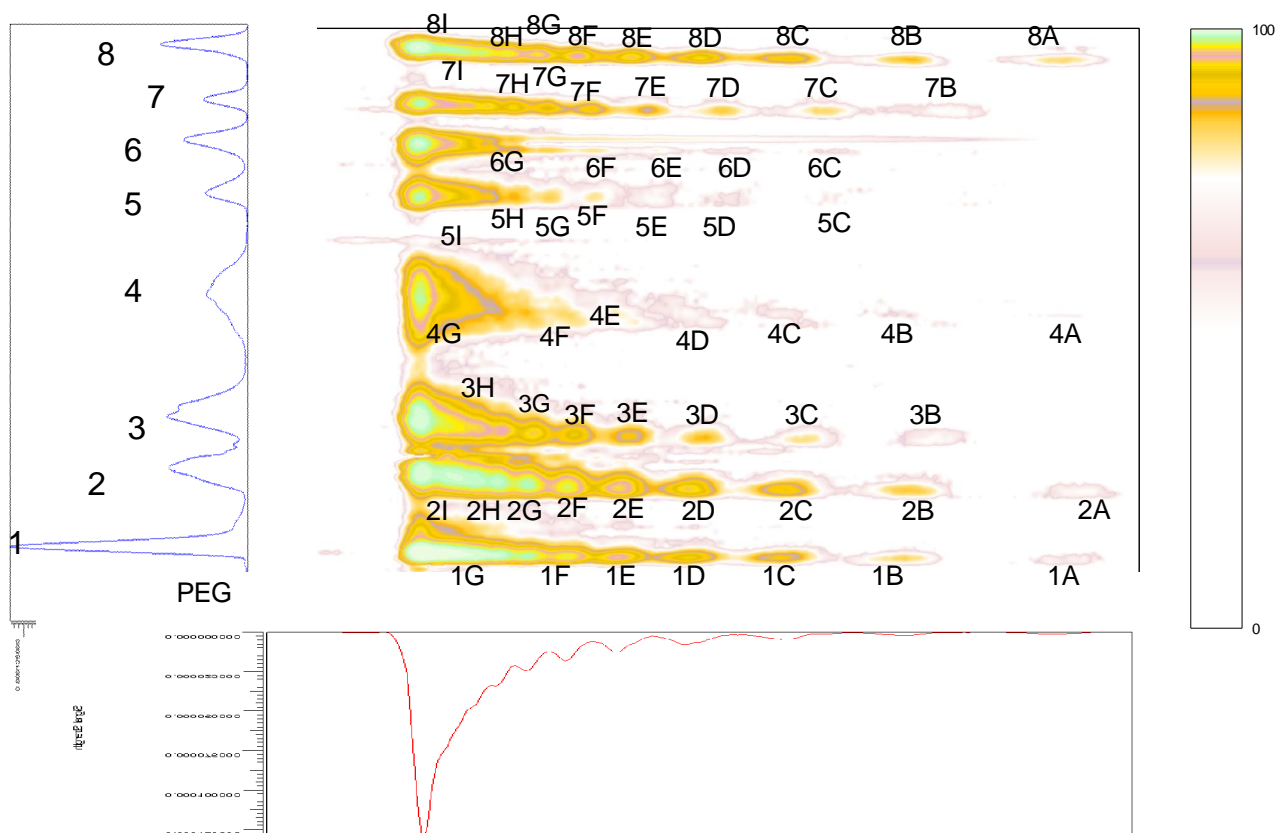
Signal in Projektion (Abb. 5.9)	Endgruppe	$E_v$ (min)
1	PEG	2.1
2	$\text{C}_{10}$	3.7
3	Nonylphenol	5.5
4	$\text{C}_{12}$	7.0
5	$\text{C}_{13}$	9.4
6	$\text{C}_{15}$	12.3
7	$\text{C}_{16}$	13.5
8	$\text{C}_{18}$	15.4

Der Peak bei einer Retentionszeit von 2.1 min wurde als PEG identifiziert. Die Signale bei 3.7 min und 9.4 min wiesen eine Überlagerung von mehreren isomeren Verteilungen auf. Dennoch lassen sich diese Peaks über ihre Retentionszeiten in der Chromatographie als  $\text{C}_{10}$ -PEG und  $\text{C}_{13}$ -PEG zuordnen. Die Gegenwart isomerer Endgruppen bei diesen Komponenten wurde in weiteren NMR-Untersuchungen über die Identifizierung von tertiären CH-Gruppen bestätigt<sup>110</sup>. Mit zunehmender Länge der Endgruppen steigt das Elutionsvolumen wie in Tab. 5.1 zu erkennen ist.

#### 5.4 LC-CC-LAC-Kopplung (2D-Chromatographie)

Das ultimative Ziel einer chromatographischen Trennung von PEOs ist die Auftrennung nach Endgruppen mit einer eindeutigen Zuordnung der

zugehörigen Oligomerverteilungen. In Kap. 5.2 und 5.3 wurde dies durch Auswertung der Ergebnisse der LC-MALDI-ToF und LC-NMR am Beispiel des Nonylphenyl-PEG erfolgreich demonstriert. Um dies für alle Komponenten der PEG-Modellmischung durchzuführen, wurde diese in einer 2D-Kopplung zunächst nach den Endgruppen (LC-CC) und anschließend jede Endgruppenfraktion in die einzelnen Oligomere (LAC) getrennt. In der 2D-Chromatographie wird die LC-CC mit der LAC online über ein Schaltventil gekoppelt (Abb. 2.2). Auf diesem Weg wird das gesamte Eluat der 1. Dimension in 100  $\mu\text{l}$ -Portionen in die 2. Dimension überführt. Abb. 5.11 zeigt den erhaltenen Konturplot der 2D-Chromatographie (LC-CC gegen NP-LC) der Modellmischung aus PEOs mit unterschiedlichen Endgruppen (vgl. Tab. 4.1). Die Ordinate von Abb. 5.11 spiegelt die 1. Dimension oder LC-CC wider. Die einzelnen Endgruppen und Oligomeren sind in Tab. 5.2 detailliert aufgeführt.



**Abb. 5.11** Konturplot der 2D-Auftrennung von PEO mit verschiedenen Endgruppen (13 mg/ml) durch RP-LC in der 1. Dimension: stationäre Phase: XTerra C<sub>18</sub>, 30 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: MeOH/Wasser 80:20 v/v, Fluss 0,04 ml/min und durch NP-LC in der 2. Dimension: stationäre Phase: Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: Isopropanol/Wasser 88:12 v/v, Fluss 3 ml/min

**Tab. 5.2** Zuordnung von Oligomerisierungsgrad und Endgruppe der Signale im Konturplot

Peak	Endgruppe	n	Code
1	C <sub>10</sub>	16	1A
		15	1B
		14	1C
		13	1D
		12	1E
		11	1F
		4-10	1G
2	Nonylphenyl	16	2A
		15	2B
		14	2C
		13	2D
		12	2E
		11	2F
		10	2G
		9	2H
		4-8	2I
3	C <sub>12</sub>	15	3B
		14	3C
		13	3D
		12	3E
		11	3F
		10	3G
		4-9	3H
4	C <sub>13</sub>	16	4A
		15	4B
		14	4C
		13	4D
		12	4E
		11	4F
		4-10	4G
5	C <sub>14</sub>	14	5C
		13	5D
		12	5E
		11	5F
		10	5G
		9	5H
		4-8	5I
6	C <sub>15</sub>	14	6C
		13	6D
		12	6E
		11	6F
		4-10	6G
7	C <sub>16</sub>	15	7B
		14	7C
		13	7D
		12	7E
		11	7F
		10	7G
		9	7H
		4-8	7I

8	C <sub>18</sub>	16	8A
		15	8B
		14	8C
		13	8D
		12	8E
		11	8F
		10	8G
		9	8H
		4-8	8I

Wie in Abb. 5.11 zu erkennen ist, sind in der 1. Dimension alle Funktionalitätsfraktionen basisliniengetrennt. Die Reichweite der Auftrennung in die einzelnen Oligomerfraktionen in der 2. Dimension unterscheidet sich je nach betrachteter Endgruppe, wie bereits in Abb. 5.3 gezeigt. So werden für die Endgruppen 1, 5, 7 und 8 (C<sub>10</sub>- C<sub>14</sub>-, C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-PEG) die Oligomeren bis herunter zu n = 8 aufgetrennt, während für Nonylphenyl- und C<sub>12</sub>-PEG (Peak 2 bzw. 3) die Oligomeren bis zu n = 9 und für C<sub>13</sub>- und C<sub>15</sub>-PEG (Peak 4 bzw. 6) die Oligomeren bis zu n = 10 zugeordnet werden können.

Die Gesamtdauer des 2D-Experiments betrug ca. 4 Stunden. Bei gleich bleibendem Elutionsvolumen der ersten Dimension (12 ml) besteht prinzipiell eine Möglichkeit zur Beschleunigung der Messung in der Erhöhung der Flussrate in der zweiten Dimension. Dies ist jedoch aufgrund des Druckanstiegs und Verlustes an Auflösung nicht praktikierbar (Abb. 5.8). Eine Alternative, die Verwendung einer größeren Speicherschleife bei gleichzeitiger Erhöhung der Flussrate in der ersten Dimension, führt ebenfalls zu einem Verlust an Auflösung. Damit ist im vorliegenden Fall eine weitere Beschleunigung des Experimentes nicht möglich.

## 6 Schnelle chromatographische Verfahren zur Charakterisierung von EO-PO-Blockcopolymeren

Blockcopolymere aus Ethylenoxid und Propylenoxid (EO-b-PO) finden Anwendung als synthetische Gleitmittel, Emulgatoren und Entschäumer. Dabei wird der amphiphile Charakter dieser Blockcopolymere genutzt. Die amphiphilen Eigenschaften werden durch die Gesamtmolmasse und die Kettenlängen der Blöcke bestimmt. Dabei ist der EO-Block hydrophil und der PO-Block hydrophob. Darüber hinaus werden die amphiphilen Eigenschaften auch durch Anteile der Homopolymeren PEO und PPO beeinflusst. Um Struktur-Eigenschaftsbeziehungen zu erarbeiten, ist es daher notwendig, eine analytische Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, sowohl eventuell vorhandene Homopolymeranteile zu quantifizieren als auch die Molmassenverteilung jedes Blockes zu bestimmen. Ein weiteres Einsatzgebiet für eine derartige analytische Methode ist die produktionsbegleitende Qualitätskontrolle.

Für die Bestimmung der Blocklängen in EO-PO-Blockcopolymeren kann man von folgender Betrachtung ausgehen. Die freie Gibbs-Enthalpie des Blockcopolymeren ( $\Delta G_{Block}$ ) setzt sich aus den anteilmäßig gewichteten freien Enthalpien des EO- und PO-Blockes ( $\Delta G_{PEO}$  bzw.  $\Delta G_{PPO}$ ) zusammen (Gl. 6.1).

$$\Delta G_{Block} = \Sigma (n\Delta G_{EO} + m\Delta G_{PO}) \quad 6.1$$

Arbeitet man unter kritischen Bedingungen für PEO, wird der EO-Block im Copolymer chromatographisch unsichtbar und das Elutionsverhalten wird durch den PO-Block bestimmt (Gl. 6.2 – 6.4). Der Verteilungskoeffizient,  $K_d$ , des Blockcopolymeren entspricht dann demjenigen des PO-Blockes.

$$\Delta G_{EO} = 0 \quad 6.2$$

$$\Delta G_{Block} = \Sigma m\Delta G_{PO} \quad 6.3$$

$$K_d^{Block} = K_d^{PO} \quad 6.4$$

Unter kritischen Bedingungen für PPO ist der PO-Block chromatographisch unsichtbar und das Elutionsverhalten wird durch den EO-Block bestimmt (Gl. 6.5 – 6.7). Der Verteilungskoeffizient des Blockcopolymeren entspricht dann demjenigen des EO-Blockes.

$$\Delta G_{PO} = 0 \quad 6.5$$

$$\Delta G_{Block} = \Sigma n \Delta G_{EO} \quad 6.6$$

$$K_d^{Block} = K_d^{EO} \quad 6.7$$

Durch geeignete Wahl der mobilen und der stationären Phase ist es möglich, selektiv für einen Block kritische Bedingungen einzustellen und gleichzeitig das Elutionsverhalten des „nicht kritischen“ Blockes zu bestimmen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der EO-Block polar und der PO-Block unpolar ist. Die theoretisch möglichen Kombinationen aus stationärer und mobiler Phase und die daraus resultierenden Elutionsmodi der einzelnen Blöcke sind in Tab. 6.1 zusammengefasst.

**Tab. 6.1** Mögliche Kombinationen aus stationärer und mobiler Phase und daraus resultierendes Elutionsverhalten der einzelnen Blöcke in EO-PO-Blockcopolymeren

Möglichkeit	Phase	Polarität der mobilen Phase	EO	PO
1	RP	Hoch	LC-CC	LAC
2	RP	Niedrig	SEC	LC-CC
3	NP	Hoch	LC-CC	SEC
4	NP	Niedrig	LAC	LC-CC

Arbeitet man auf einer RP-Phase unter LC-CC-Bedingungen für EO (hohe Lösungsmittelpolarität) eluiert der unpolare PO-Block im LAC Modus. Dabei kann PPO-Homopolymer mit hoher Molmasse möglicherweise stark auf der Säule adsorbieren und nur durch Anwendung eines Gradienten eluiert werden. Arbeitet man auf der gleichen stationären Phase unter kritischen Bedingungen für PO (niedrige Polarität der mobilen Phase), eluiert PEO-Homopolymer im SEC-Modus. Auf NP-Phasen vertauscht sich das



Elutionsverhalten des Blockes, der jeweils nicht unter kritischen Bedingungen eluiert. So eluiert PPO unter kritischen Bedingungen für PEO im SEC-Modus, und PEO eluiert unter kritischen Bedingungen für PPO im LAC-Modus.

Bekannt sind die kritischen Bedingungen für PEO auf RP-Phasen (wässriges Methanol, Aceton oder Acetonitril als Eluent)<sup>95-99</sup> und auf NP-Phasen (wässriges Methanol bzw. Acetonitril als Eluent)<sup>97,99</sup>. Auf der unpolaren Phase eluiert PPO unter diesen Bedingungen im LAC-Modus (Fall 1), während über das Elutionsverhalten von PPO auf NP-Phasen (Fall 3) nichts bekannt ist.

### **6.1 Kritische Bedingungen für PPO auf einer unpolaren Phase**

Ziel des folgenden Abschnittes ist es nun, eine chromatographische Methode zur Untersuchung von EO-PO-Blockcopolymeren zu entwickeln. Die in Tab. 6.1 beschriebenen Fälle 1 und 4 sind ungünstig, da der LAC-Modus für die jeweils „nicht kritischen“ Blöcke zu starker Adsorption führen kann. Dies bedeutet, dass Polymeranteile auf der stationären Phase verbleiben und möglicherweise nur durch einen Gradienten wieder entfernt werden können. Zusätzlich gelten unter Gradientenbedingungen Gl. 6.3 bzw. 6.6 nicht mehr, so dass der „kritische“ Block nicht mehr chromatographisch unsichtbar ist und das Elutionsverhalten des zu betrachtenden „nicht kritischen“ Blockes beeinflusst. Erfolgversprechend als chromatographische Methode ist jedoch die Kombination von LC-CC und SEC (Möglichkeiten 2 und 3 in Tab. 6.1), die sowohl eine vollständige Elution als auch die Erstellung von Kalibrationskurven erlaubt. Zusätzlich ist es unter diesen Bedingungen möglich, Homopolymeranteile des „kritischen“ Blocks nachzuweisen und nach geeigneter Kalibration des Detektors zu quantifizieren.

Tab. 6.2 zeigt eine Zusammenstellung der untersuchten Blockcopolymere mit den gemessenen  $M_w$ -Werten relativ zu einer PEO-Kalibration.

**Tab. 6.2** EO-Gehalte (Herstellerangabe) und über SEC gegen PEO-Kalibration bestimmte  $M_w$  für EO-PO-Blockcopolymere

Probe	Blockabfolge	Gew.-% EO	$M_w$ (g/mol) (Hersteller)	$M_w$ (g/mol) (SEC)
Copol. 1	EO-PO	40	2650	2300
Copol. 2	EO-PO	20	3100	2600
Copol. 3	EO-PO	10	3500	3000
Copol. 4	PO-EO	10	2600	2700
Copol. 5	PO-EO	20	3650	3700

Es war nicht möglich, kritische Bedingungen für PPO auf einer  $C_{18}$ -modifizierten Kieselgel-Phase zu finden. Der Grund dafür ist, dass es auch nach einem umfangreichen Screening von wässrigem Methanol, Aceton oder Acetonitril nicht gelang, für PPO eine Elution im SEC-Modus zu erreichen. In Anlehnung an die Arbeiten von Trathnigg et al.<sup>106</sup> gelang es durch Anwendung einer noch unpolareren stationären Phase, die keine freien Silanolgruppen enthält (einer reinen Polymerphase), den kritischen Punkt für PPO einzustellen. Gemäß Tab. 6.1 sollte PEO im SEC-Modus eluieren, wenn PPO unter diesen Bedingungen im LC-CC Modus eluiert. Abb. 6.1 zeigt die Elugramme für PEO-Standards unter kritischen Bedingungen für PPO.

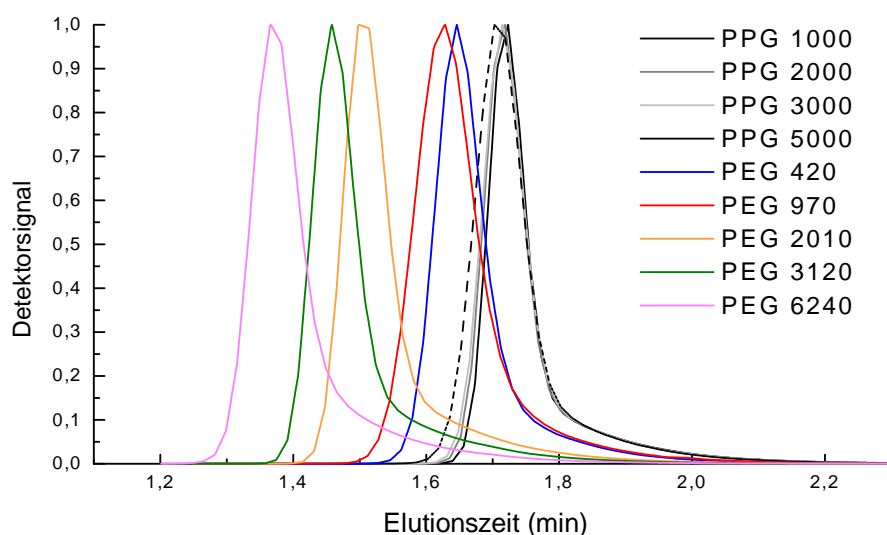
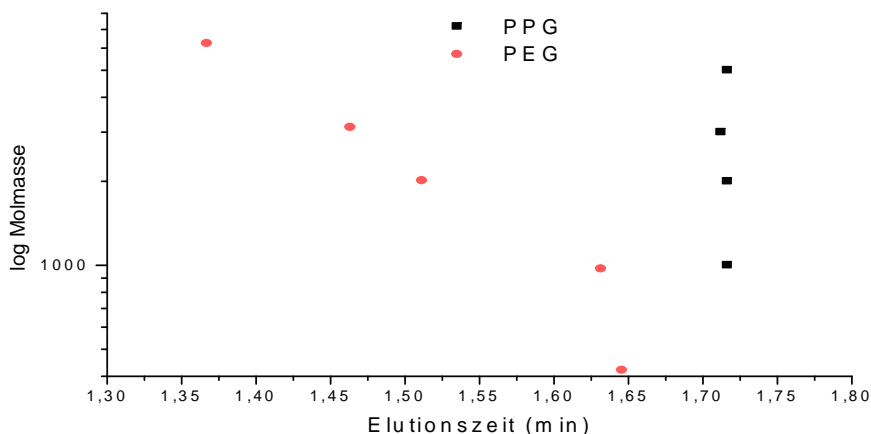
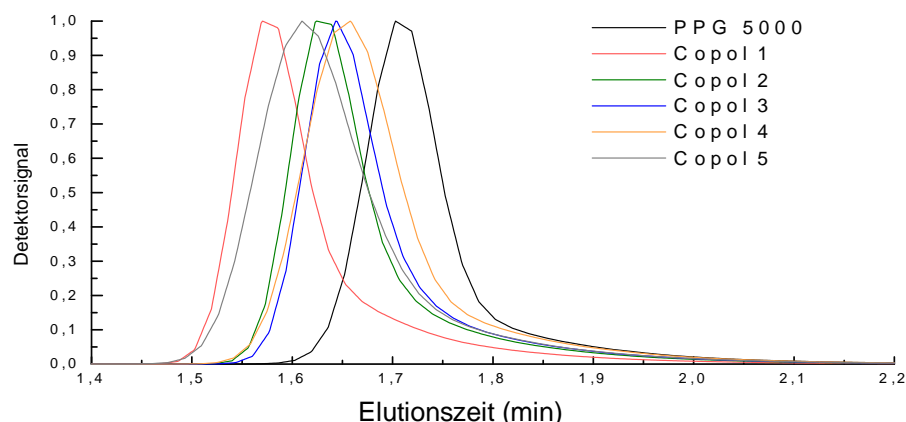
**Abb. 6.1** Auftrennung von PPO- und PEO-Standards durch LC-CC für PPO, stationäre Phase: PLRP-S, 150 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 23:77 v/v, THF-AcN, Fluss: 1 ml/min

Abb. 6.1 zeigt, dass es möglich ist, einen kritischen Punkt für PPO auf einer unpolaren Phase ohne freien Silanolgruppen bei 23:77 v/v THF:AcN zu finden. Unter diesen Bedingungen liegen die Peak-Maxima der PPO-Standards bei einem Elutionsvolumen von 1,73 ml. Alle Peaks weisen ein Tailing auf. Wie erwartet, eluiert PEO unter diesen Bedingungen im SEC-Modus und die Peak-Maxima sind voneinander getrennt. Mit Hilfe von PEO-Standards kann nun eine Kalibrationskurve erstellt werden (Abb. 6.2).



**Abb. 6.2** Kalibrationskurve für PEO-Standards unter LC-CC-Bedingungen für PPO, stationäre Phase: PLRP-S, 150 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 23:77 v/v THF-AcN, Fluss: 1 ml/min

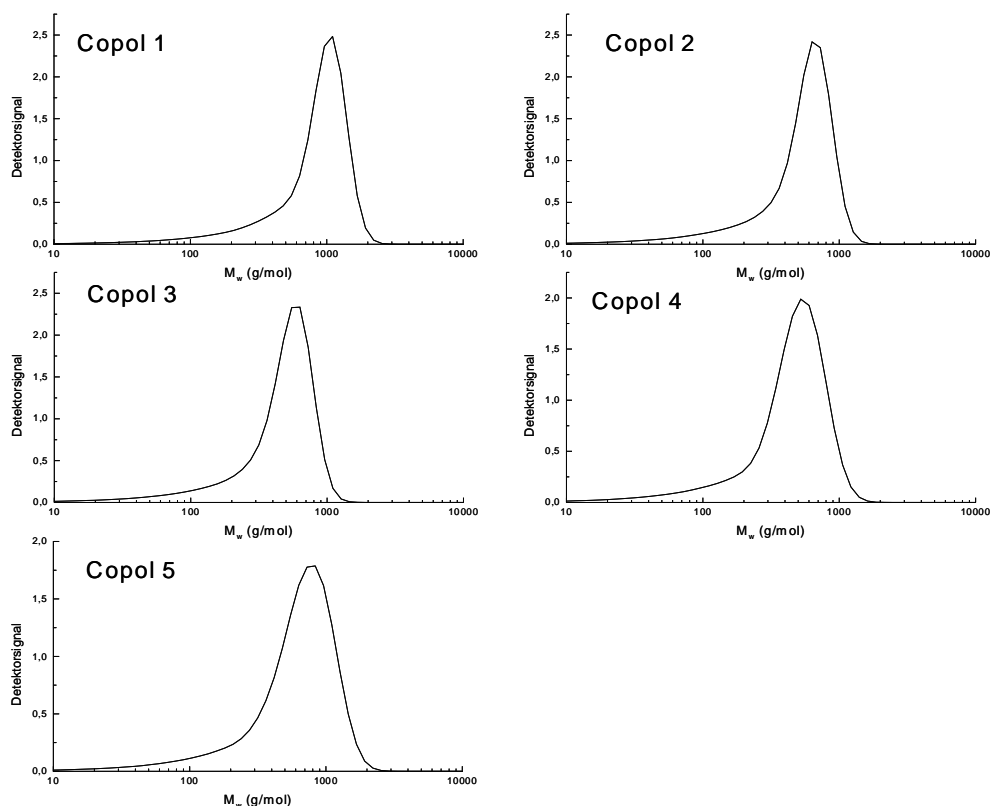
Wie in Abb. 6.2 zu erkennen, eluieren alle PPO-Standards bei 1,73 min. Für die verwendeten PEO-Standards ergibt sich über einen weiten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen und Molmasse. Die Abweichung des niedermolekularsten Standards (420 g/mol) ist auf die Trennschwelle der Säule zurückzuführen. Die Elugramme der Copolymere und von PPO 5000 sind in Abb. 6.3 gezeigt.



**Abb. 6.3** Überlagerung der Elugramme der PEO-Blöcke der Blockcopolymeren mit PPO 5000 bei LC-CC Bedingungen für PPO, 23:77 v/v THF-AcN, Fluss: 1 ml/min

Da die Elution unter kritischen Bedingungen für PPO stattfindet, ist diese Komponente des Blockcopolymers chromatographisch unsichtbar. Das Elutionsvolumen des erhaltenen Peaks korreliert daher unter diesen Bedingungen mit der Länge des PEO-Blocks. Alle Peaks weisen ein tailing auf, welches sich in den Elutionsbereich des PPO (1,73 ml) erstreckt. Daher ist in dem gegebenen Fall die Bestimmung von eventuell vorhandenem PPO-Homopolymer nicht möglich. Die Auflösung dieses Systems kann jedoch durch Vergrößerung des zur Verfügung stehenden Porenvolumens (längere Säulen) verbessert werden.

Mit Hilfe der Kalibration (Abb. 6.2) ist es nun möglich, die mittlere Molmasse des PEO-Blockes zu bestimmen. Aufgrund des Tailings ist es jedoch nicht möglich, die Molmassenmittelwerte ( $M_w$ ,  $M_n$ ) und die Polydispersitäten zu bestimmen. Alle Copolymere eluieren zwischen 1.57 und 1.66 min. Aus der Überlagerung in Abb. 6.3 geht hervor, dass Copol.1 die größte und Copol. 4 die kleinste EO-Blocklänge aufweist. Abb. 6.4 zeigt die erhaltenen Molmassenverteilungen der PEO-Blöcke der Copolymeren.



**Abb. 6.4** Molmassenverteilungen der PEO-Blöcke der Blockcopolymeren durch LC-CC für PPO, stationäre Phase: PLRP-S, 150 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 23:77 v/v THF-AcN, Fluss: 1 ml/min

Aus der Herstellerangabe der Bruttomolmassen der Proben und dem angegebenen Massenanteil des EO-Blockes wurde die Molmasse des EO-Blockes errechnet. In Tab. 6.4 sind die so berechneten Molmassen der EO-Blöcke und die experimentell mittels PEO-Kalibration unter LC-CC-Bedingungen für PPO gemessenen  $M_p$  der EO-Blöcke gegenübergestellt.

**Tab. 6.4** Berechnete und experimentell (mittels LC-CC) gemessene  $M_p$  für den EO-Block der EO-PO-Blockcopolymere

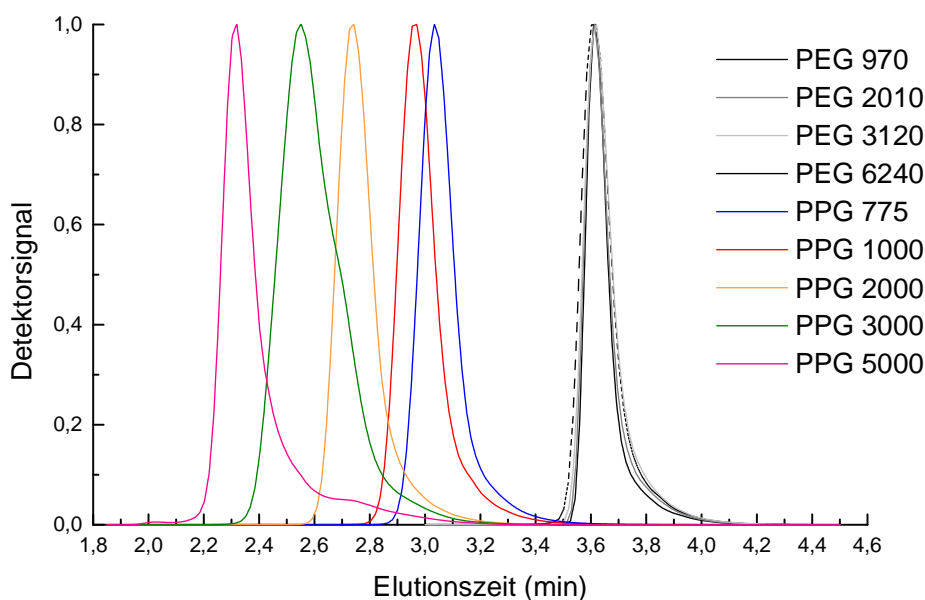
Probe	Berech. M (EO) (g/mol)	Exp. $M_p$ (EO) (g/mol)
Copol. 1	1060	1030
Copol. 2	620	650
Copol. 3	350	590
Copol. 4	270	520
Copol. 5	740	800

Aus Tab. 6.4 ist zu erkennen, dass für Molmassen größer als 600 g/mol eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten und experimentell gemessenen Massen besteht. Die Abweichung im niedrigen Molmassenbereich ist möglicherweise auf das Erreichen der unteren Trennschwelle der Säule zurückzuführen.

## 6.2 Kritische Bedingungen für PEO auf einer polaren Phase

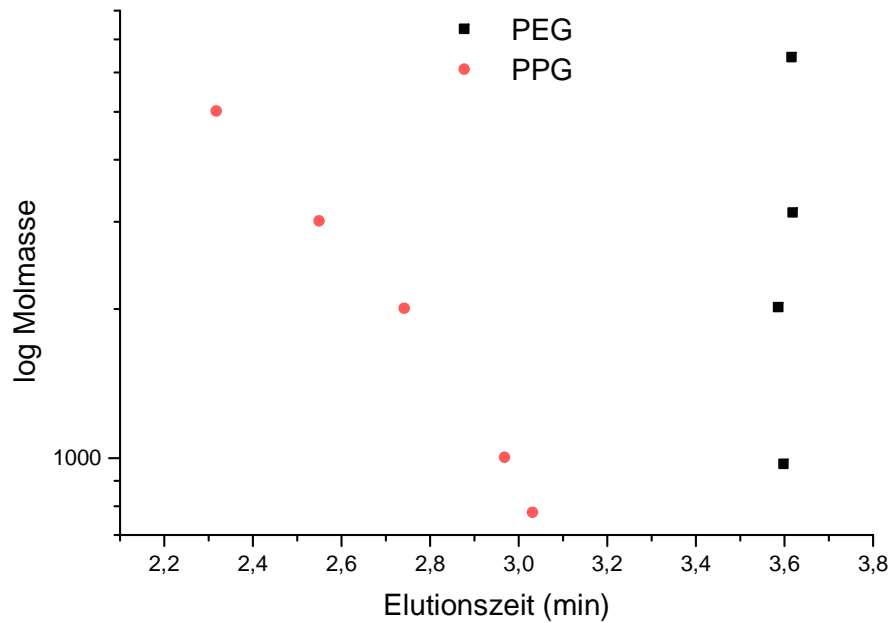
Es gibt in der Literatur nur zwei Hinweise auf kritische Bedingungen für PEO auf einer polaren Phase<sup>97,99</sup>. Dabei werden Amino-modifizierte stationäre Phasen mit Methanol-Wasser oder Acetonitril-Wasser als mobiler Phase eingesetzt. Über das Elutionsverhalten von PPO unter diesen Bedingungen gibt es keine Informationen. Gemäß Tab. 6.1 sollte PPO auf einer polaren Phase unter kritischen Bedingungen für PEO im SEC-Modus eluieren. Nach Trathnigg et al.<sup>112</sup> wird der kritische Punkt für PEO auf einer stationären Diol-Phase in einem Aceton-Wasser-Gemisch von 78,54:21,46 m/m gefunden.

Bei der hier verwendeten Diol-Phase von Macherey und Nagel wurden die kritischen Bedingungen für PEO bei einer Eluentenzusammensetzung von Aceton-Wasser 84:16 v/v gefunden. Abb. 6.5 zeigt die Chromatogramme für PEO- und PPO-Standards unter diesen Bedingungen.



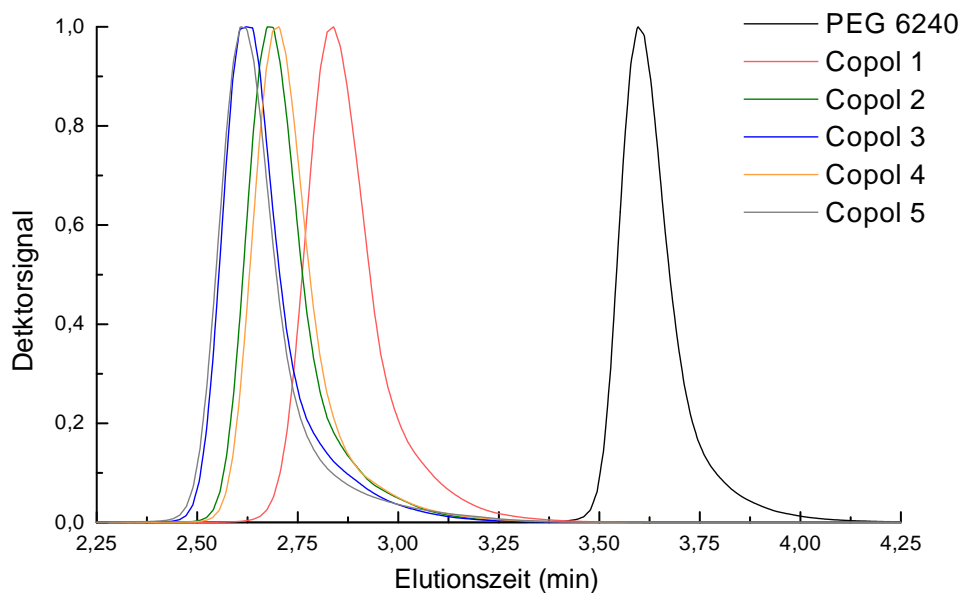
**Abb. 6.5** Auftrennung von PEO- und PPO-Standards durch LC-CC für PEO, stationäre Phase: M&N Nucleosil 100-5 OH (Diol), 250 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 84:16 v/v Aceton-H<sub>2</sub>O, Fluss: 1 ml/min

Wie erwartet eluiert PPO im SEC-Modus, wobei alle Peaks ein Tailing zeigen. Im Gegensatz zum vorher untersuchten System erhält man eine klare Abtrennung aller PPO-Standards von den kritisch eluierenden PEO-Standards. Durch Elution von PPO-Standards kann nun analog zu dem vorher für PPO beschriebenen System eine Kalibrationskurve erstellt werden (Abb. 6.6).



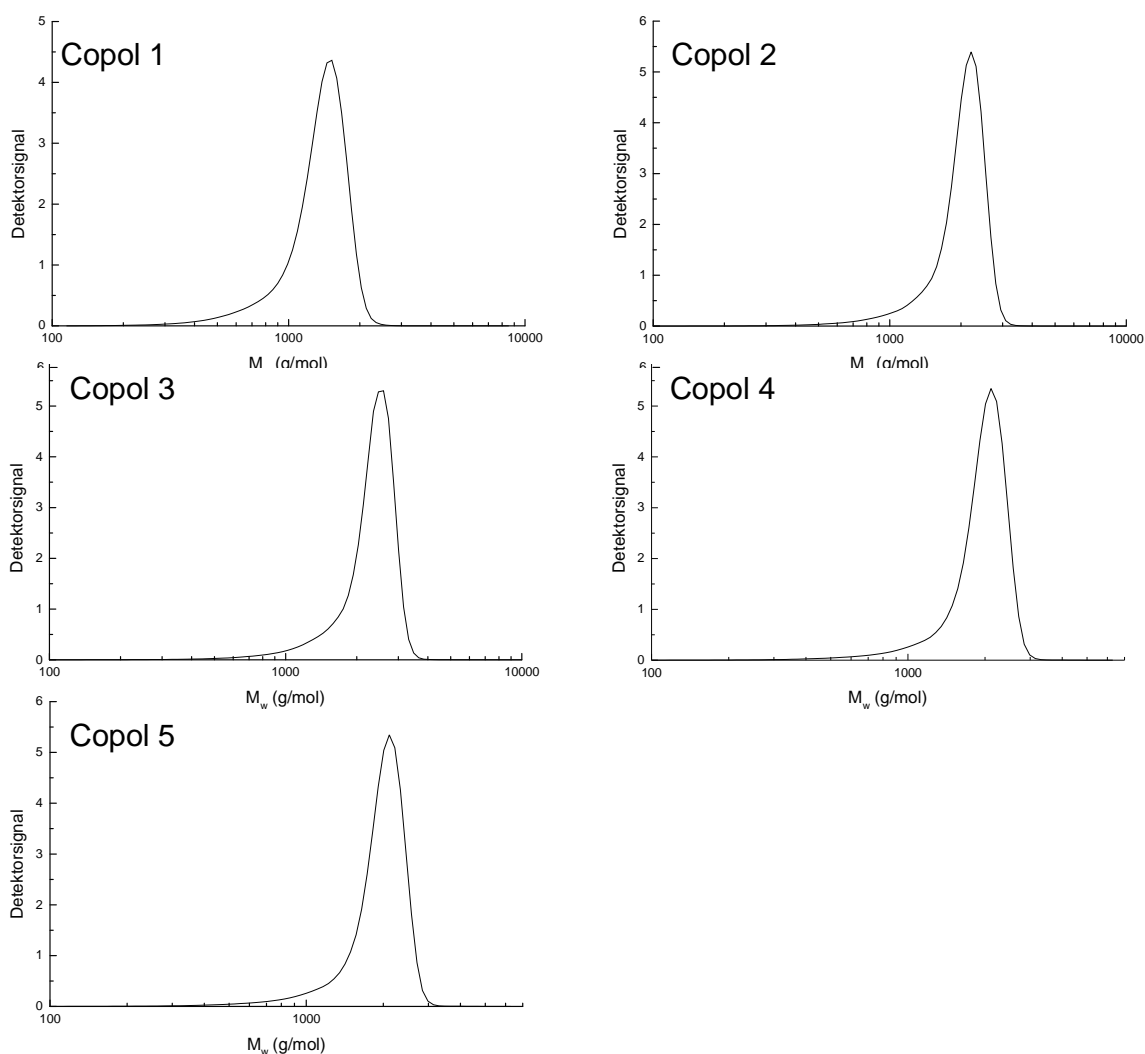
**Abb. 6.6** Kalibrationskurve für PPOs unter LC-CC-Bedingungen für PEO, stationäre Phase: M&N Nucleosil 100-5 OH (Diol), 250 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 84:16 v/v Aceton-H<sub>2</sub>O, Fluss: 1 ml/min

Man erkennt für die PPO-Standards einen linearen Zusammenhang zwischen log M und der Elutionszeit während alle PEO-Standards bei 3,6 min eluieren. Im Gegensatz zum vorher beschriebenen System ist auch für den niedermolekularsten PPO-Standard (775 g/mol) kein Abweichen von der linearen Beziehung zu beobachten. Die Elugramme der Copolymeren und eines PEO-Standards (PEO 6240 g/mol) in diesem chromatographischen System sind in Abb. 6.7 gezeigt.



**Abb. 6.7** Überlagerung der Elugramme der Blockcopolymeren mit PEO 6240 unter LC-CC-Bedingungen für PEO, stationäre Phase: M&N Nucleosil 100-5 OH (Diol), 250 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 84:16 v/v Aceton-H<sub>2</sub>O, Fluss: 1 ml/min

Da die Elution unter kritischen Bedingungen für PEO stattfindet, ist der PEO-Anteil im Blockcopolymer chromatographisch unsichtbar und das Elutionsvolumen korrespondiert mit der PPO-Blocklänge. Da in keinem der Copolymer-Elugramme ein Peak bei 3,6 ml zu beobachten ist, kann man darauf schließen, dass diese Proben kein PEO-Homopolymer enthalten. Mit Hilfe der Kalibration (Abb. 6.6) ist es nun möglich, die Molmasse des PPO-Blocks am Peak-Maximum,  $M_p$ , zu berechnen. Die erhaltenen Molmassenverteilungen sind in Abb. 6.8 gezeigt.



**Abb. 6.8** Molmassenverteilungen der PPO-Blöcke der Blockcopolymere durch LC-CC für PEO, stationäre Phase: M&N Nucleosil 100-5 OH (Diol), 250 x 4,6 mm I.D., mobile Phase: 84:16 v/v Aceton-H<sub>2</sub>O, Fluss: 1 ml/min

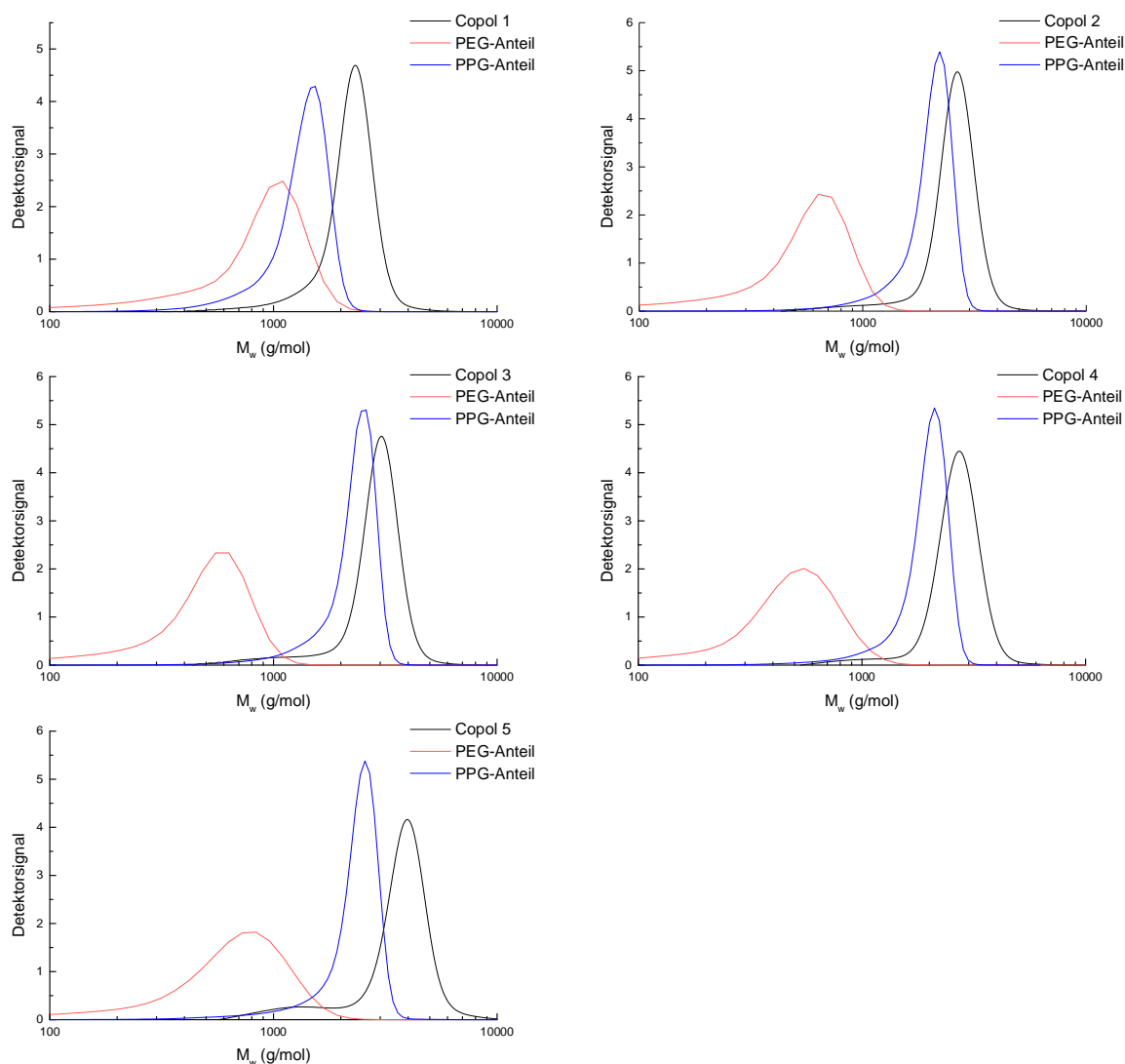


Analog zu Kap. 6.1 wurde aus der Herstellerangabe der Bruttomolmasse und dem angegebenen Massenanteil des PO-Blockes die Molmasse des PO-Blockes errechnet. In Tab. 6.5 sind die so berechneten Molmassen der PO-Blöcke und die experimentell mittels PPO-Kalibration unter LC-CC-Bedingungen für PEO gemessenen  $M_p$  der PO-Blöcke gegenübergestellt.

**Tab. 6.5** Aus SEC-Messung und PO-Blocklänge der Gesamtprobe (Herstellerangabe) berechnete und experimentell mittels LC-CC gemessene  $M_p$  für den PO-Block der EO-PO-Copolymere

Probe	Berech. M (PO) (g/mol)	Exp. $M_p$ (PO) (g/mol)
Copol. 1	1590	1460
Copol. 2	2480	2200
Copol. 3	3150	2500
Copol. 4	2330	2100
Copol. 5	2910	2600

Man erkennt eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten und den experimentell gemessenen Werten. Abschließend ist eine Überlagerung der jeweils unter kritischen Bedingungen gemessenen Molmassenverteilungen der einzelnen Blöcke und der mittels SEC gemessenen Molmassenverteilungen der Probe gezeigt. In Tab. 6.6 sind die mittleren Molmassen aus MALDI-ToF (Maximum des intensivsten Peaks), aus der SEC der Gesamtproben ( $M_w$ ) und die mittels LC-CC für PEO bzw. PPO gemessenen Molmassen der jeweiligen Blöcke am Peak-Maximum ( $M_p$ ) zusammengefasst.



**Abb. 6.9** Überlagerung der Molmassenverteilungen der Gesamtproben mit denen der EO- und PO-Blöcke

**Tab. 6.6** Experimentelle  $M_w$  (mittels SEC) für die EO-PO-Copolymere und die EO- bzw. PO-Blöcke

Probe	$M_w$ (gesamt) (g/mol)	$M_w$ (gesamt) <sub>MALDI</sub> (g/mol)	$M_p$ (EO) (g/mol)	$M_p$ (PO) (g/mol)
Copol. 1	2300	2300	1030	1460
Copol. 2	2600	2500	650	2200
Copol. 3	3000	3000	590	2500
Copol. 4	2700	2600	520	2100
Copol. 5	3700	3300	800	2600

Es ist eine gute Übereinstimmung zwischen den mittels SEC und MALDI-ToF bestimmten  $M_w$ -Werten der Proben festzustellen. Die mittels LC-CC bestimmten Molmassen der Einzelblöcke zeigen eine befriedigende Übereinstimmung mit den gemessenen Bruttomolmassen,  $M_w$ , der Proben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelang, kritische Bedingungen für PPO auf einer stationären unpolaren PLRP-S-Phase zu finden. Mittels Kalibration gegen PEO-Standards wurden die Molmassen der EO-Blöcke in den Copolymeren untersucht. Diese Messungen konnten in weniger als zwei Minuten durchgeführt werden. In analoger Weise wurden unter kritischen Bedingungen für PEO (stationäre Diol-Phase, PPO-Kalibration) die Molmassen der PO-Blöcke ermittelt. Der Zeitbedarf für diese Messungen liegt unter vier Minuten.

Es ergab sich eine gute Übereinstimmung der für die Bruttoproben mittels SEC (PEO-Kalibration) und MALDI-ToF gemessenen Molmassen. Die Summe der mittels LC-CC gemessenen Molmassen der EO- und PO-Blöcke der Copolymere ergab eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Bruttowerten der Gesamtproben.

## 7 Zusammenfassung

Kombinatorische Methoden in der Materialforschung erfordern schnelle und präzise Methoden zur Materialcharakterisierung. Insbesondere die Bestimmung der molekularen Parameter Molmasse, chemische Zusammensetzung und Funktionalität muss mit Verfahren durchgeführt werden, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, chromatographische Methoden zur Analyse der Mikrostruktur zu entwickeln und so anzupassen, dass sie für den Einsatz in der kombinatorischen Materialforschung geeignet sind. Ein maßgeblicher Parameter dafür ist die kommerzielle Verfügbarkeit von chromatographischen Trennphasen für die SEC, LAC und LC-CC. Weiterhin sollte eine Zeitersparnis von bis zu 90 % gegenüber eingeführten Methoden erreicht werden.

Für die Beschleunigung von SEC-Trennungen wurden neue Trennphasen bei unterschiedlichen Flussraten untersucht. Hier zeigte sich, dass nicht nur die Art der stationären Phase sondern auch die Säulendimensionen einen Einfluss auf die Trennung hat. Bei der SEC von PS auf partikulären stationären Phasen aus vernetztem Polystyrol gelang es, durch Erhöhung der Flussrate auf bis zu 10 ml/min die Analysenzeit von 30 min auf 2,5 min zu reduzieren. Dies ist nur möglich, wenn zur Erniedrigung des Säulengegendruckes das Aspektverhältnis der Säulen geändert wird. Bei der Erhöhung der Flussrate bleibt die Kalibrationskurve, die ein Maßstab für die Trennleistung ist, unverändert. Für Proben mit einem  $M_w > 1000$  g/mol kann durch diese Maßnahmen eine erhebliche Verringerung der Analysenzeit im Vergleich zu konventionellen Säulen bei vergleichbarer Auflösung erzielt werden. Die Genauigkeit der Molmassenbestimmung und die verringerten Analysenzeiten ermöglichen den Einsatz der chromatographischen Methoden in der kombinatorischen Materialforschung. Im Oligomerbereich ( $M_w > 1000$  g/mol) gelingt es nicht, unter Beibehaltung der Auflösung die gleiche Zeitersparnis zu erreichen.

In weiteren Anwendungen wurde die SEC von Methacrylsäure-haltigen Polymethacrylaten in DMAc mit Salz- und Säurezusatz und von Polystyrolsulfonaten in einer wässrigen mobilen Phase unter Zusatz von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  untersucht. Mit stationären Phasen auf der Basis von Polyester bzw. sulfoniertem Polystyrol konnten Flussraten bis zu 6 ml/min genutzt werden. Die Steigung der Kalibrationskurven ändert sich bei der Flussratenerhöhung nicht aber die Schwankung der gemessenen mittleren Molmassen technischer Proben nimmt jedoch zu. Die Gesamtmesszeit konnte von 22 min auf 5 min reduziert werden.

Polyethylenoxide (PEO) gehören zu den wichtigsten hydrophilen Polymeren. Sie werden durch Ethoxylierung von Fettalkoholen, Alkylphenolen oder mehrwertigen Alkoholen hergestellt und werden als reaktive Komponente bei der Herstellung von Polyestern und Polyurethanen eingesetzt. Außerdem finden sie in kosmetischen Präparationen wie z.B. Cremes und als Zusätze in Waschmitteln (Tenside) Anwendung. Mittels LC-CC unter herkömmlichen Bedingungen können unterschiedlich terminierte PEOs in 140 Minuten getrennt werden. Durch Anwendung von Gradienten gelang es, die Messzeit auf 50 Minuten zu reduzieren. Kommerziell erhältliche und in der Länge reduzierte Säulen, die erhöhte Flussraten zulassen, wurden im Hinblick auf Auflösung und Trennzeit systematisch mit isokratischen und Gradientenmethoden untersucht. Dabei gelang es, auf einer  $\text{C}_8$ -modifizierten stationären Phase durch Erhöhung der Flussrate auf bis zu 8 ml/min und durch den Wechsel von einer isokratischen auf eine Gradientenmethode, die Trennzeit auf 2 Minuten zu reduzieren. Im Hinblick auf den Quotienten aus Auflösung und Messzeit lieferte eine monolithische Phase die besten Ergebnisse.

Durch Normalphasenchromatographie auf einer Chromolith<sup>®</sup>-Phase konnten unterschiedlich terminierte PEOs innerhalb von 4 min in die einzelnen Oligomere aufgetrennt werden. Die angewandte Flussrate von 4 ml/min erlaubt eine Zeitersparnis von 60 %. Dabei ist der Verlust an Auflösung für die mit den längeren Endgruppen terminierten Komponenten geringer.

Für Nonylphenyl-terminiertes PEO konnte der Oligomerisierungsgrad durch eine Kopplung der Chromatographie mit der Kernresonanzspektroskopie und mit der MALDI-ToF bestimmt werden. Eine spektroskopische Identifizierung der Endgruppen bei der Auftrennung einer PEG-Modellmischung aus unterschiedlich terminierten Komponenten konnte durch on-line Kopplung der LC-CC mit der Kernresonanzspektroskopie erreicht werden. Über den Zusammenhang zwischen chromatographischer Retention und Oligomerisierungsgrad konnten bei der zweidimensionalen Auftrennung von unterschiedlich terminierten PEOs durch Kopplung von LC-CC und LAC die Oligomerenverteilungen der jeweiligen Funktionalitätsfraktionen bestimmt werden.

Es gelang, chromatographische Trennmethoden zur Bestimmung der individuellen Blocklängen von Blockcopolymeren aus Ethylenoxid und Propylenoxid zu entwickeln. So konnten unter kritischen Bedingungen für PEO die Molmassen der PPO-Blöcke innerhalb von 4 Minuten bestimmt werden. Erstmals gelang es, kritische chromatographische Bedingungen für PPO auf einer unpolaren Phase zu finden. Mit diesen chromatographischen Bedingungen konnten die Molmassen der PEO-Blöcke innerhalb von 2 Minuten analysiert werden.

## 8. Experimenteller Teil

### 8.1 Chromatographische Systeme

Für die chromatographischen Messungen wurde eine Shimadzu 10 AD VP HPLC-Anlage, bestehend aus zwei Pumpen, Entgaser und Autosampler verwendet. Die Temperierung geschah durch einen Säulenofen K4 von Techlab. Als Detektoren wurden ein Verdampfungslichtstreuendetektor ELSD 1000, (Polymer Laboratories, Church Stretton, England), ein UV-Detektor UV 2000 (Spectra System) und ein RI-Detektor (Waters) eingesetzt. Für die 2D-Messungen wurde zusätzlich ein 8-Port-Ventil der Fa. Valco, Modell ET8GW verwendet, um die erste Dimension mit der zweiten Dimension zu verbinden. Das 8-Port-Ventil war mit zwei Probenschleifen von je 100 µl ausgerüstet sowie mit einem elektrischen Schnellantrieb der Fa. Valco, Modell MicroDrive. Die Datenaufnahme und -auswertung für alle chromatographischen Methoden erfolgte mit der Software PSS WinGPC „Unity“ der Firma Polymer Standards Service GmbH (Mainz, Deutschland).

### 8.2 Säulen

- Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 µm Partikeldurchmesser, 250 x 4,6 mm I.D. (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4,6 mm I.D. and 50 x 4.6 mm I.D. (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Chromolith C<sub>8</sub>, 100 x 4,6 mm I.D. (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Luna RP-18, 3 µm Partikeldurchmesser, 30 x 4,6 mm I.D. (Phenomenex)
- XTerra RP-18, 2,5 µm Partikeldurchmesser, 30 x 4.6 mm I.D. (Waters)
- Chromolith Si, 100 x 4,6 mm I.D. (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Nucleosil 100-5 OH (Diol), 5 µm Partikeldurchmesser, 250 x 4,6 mm I.D. (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- PLRP-S, 150 x 4,6 mm I.D., 5 µm Partikeldurchmesser (Polymer Laboratories, Church Stretton, England)

- PL Rapide M, PL150 x 7,5 mm I.D., (Polymer Laboratories, Church Stretton, England)
- SDV  $10^4$  Å +  $10^5$  Å, 50 x 20 mm I.D. (PSS, Mainz, Deutschland)
- SDV 100 Å, 300 x 8 mm I.D. und 50 x 20 mm I.D. (PSS, Mainz, Deutschland)
- GRAM (Polyestermaterial ) 100 Å + 3000 Å, 300 x 8 mm I.D und 50 x 20 mm I.D. (PSS, Mainz, Deutschland)
- MCX 1000 Å +  $10^5$  Å, 300 x 8 mm I.D. und 50 x 20 mm I.D. (PSS, Mainz, Deutschland)

### 8.3 Lösungsmittel für die Chromatographie:

- Tetrahydrofuran (THF) nach Destillation und Trocknung der technischen Qualität
- *N,N*-Dimethylacetamid (DMAc) für die HPLC, Fa. Schopp, Karlsruhe
- Wasser (H<sub>2</sub>O) in Reinstwasserqualität (R = 18 MW) durch Entsalzung (Millipore Simplicity 185)
- Methanol (MeOH) für die HPLC, Acros Organics, VWR
- Lithiumbromid (LiBr) für die Analyse, Acros Organics
- Essigsäure (AcOH) für die Analyse, Acros Organics
- Aceton für die HPLC, Acros Organics, VWR
- *Isopropanol* (*i*Prop) für die HPLC, Acros Organics, VWR
- Acetonitril (AcN) für die HPLC, Acros Organics, VWR
- Natriumdihydrogenphosphat für die Analyse, Acros Organics

### 8.4 Polymerstandards

Engverteilte Polymer-Standards für die SEC wurden von der Firma Polymer Standards Service GmbH (PSS) bezogen. Dies waren: Polyethylenglykol (PEG), Polystyrol (PS) und Polymethylmethacrylat (PMMA).

### 8.5 Proben

Technisches Polyethylenglykol und Polyethylenglykol-b-Polypropyleneglykol von BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland .



## 8.6 Bestimmungen mittels MALDI-ToF-MS

Die Massenspektren wurden mit einem MALDI-ToF-Massenspektrometer Kompact MALDI IV der Firma Kratos Analytical aufgenommen. Die Datenerfassung und -auswertung wurde mit der Software Kompact durchgeführt. Als Matrix wurde 1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol) der Firma Aldrich-Chemie verwendet. Die Proben bzw. die getrockneten Fraktionen aus der Chromatographie wurden mit einer Matrixlösung gemischt und auf einen speziellen Probenträger aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde der Probenträger in das Massenspektrometer eingebracht und mit einem Stickstofflaser schrittweise bestrahlt.

## 9 Literatur

- 1 H. Pasch, M. Much, G. Schulz, A.V. Gorshkov  
*LC-GC Int.* **5** (1992) 35
- 2 H. Pasch, I. Zammert  
*J. Liquid Chromatogr.* **17** (1994) 3091
- 3 M.E. Swartz  
*Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry*  
Marcel Dekker, Inc., New York – Basel, (2000) S.113 -136
- 4 R.M. l'Abee, L.L.J.M Cornesissen, C. Diaz, M. Ligthart, M. J. de la  
Mar, S. Wijnans, B.G.G. Lohmeijer, U.S. Schubert  
*e-Polymers* (2003) T\_001
- 5 P. Kilz, H. Pasch  
*GIT Fachz. Lab.* **3** (1999) 239
- 6 M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet  
*J. Chromatogr. A* **752** (1996) 59
- 7 M. Petro, F. Svec, I. Gitsov, J.M.J. Fréchet  
*Anal. Chem.* **68** (1996) 315
- 8 C. Viklund, A. Nordström, K. Irgum, F. Svec, J.M.J. Fréchet  
*Macromolecules* **34** (2001) 4361
- 9 M. Jančo, D. Sýkora, F. Svec, J.M.J. Fréchet, J. Schweer, R. Holm  
*J. Polymer Sci.: A: Polymer Chem.* **38** (2000) 2767
- 10 D. Knecht,  
Persönliche Mitteilung (2006)
- 11 M. Adler  
*GIT Fachz. Lab.* **5** (2005) 404
- 12 H. Benoit, Z. Grubisic, P. Rempp, D. Decker, J.G. Zilliox  
*J. Chim. Phys.* **63** (1966) 1507
- 13 H.-G. Elias  
"Makromoleküle", 3. Aufl., Hüthig & Wepf, Basel – Heidelberg (1974)  
S. 300
- 14 G. Glöckner  
*Polymercharakterisierung durch Flüssigchromatographie*  
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1980), S. 94

- 15 B.G. Belenkii, E.S. Gankina, M.B. Tennikov, L.Z. Vilenchik  
*Dokl. Akad. Nauk SSSR* **231** (1976) 1147
- 16 B.G. Belenkii, E.S. Gankina  
*J. Chromatogr. Chromatogr. Rev.* **141** (1977) 13
- 17 M.B. Tennikov, P.P. Nefedov, M.A. Lazareva, S.J. Frenkel  
*Vysokomol. Soedin. Ser. A* **19** (1977) 657
- 18 A.M. Skvortsov, A.A. Gorbunov  
*J. Chromatogr.* **358** (1986) 77
- 19 B.G. Belenkii  
*J. Chromatogr.* **147** (1978) 99
- 20 S.G. Entelis, V.V. Evreinov, A.V. Gorshkov  
*Adv. Polym. Sci.* **79** (1986) 129
- 21 H. Pasch  
*Polymer* **34** (1993) 4095
- 22 H. Pasch, H. Krüger, H. Much, U. Just  
*J. Chromatogr.* **589** (1992) 295
- 23 H. Pasch, H. Much, G. Schulz, A.V. Gorshkov  
*LC-GC International.* **5** (1992) 38
- 24 H. Pasch, C. Brinkmann, H. Much, U. Just  
*J. Chromatogr.* **623** (1992) 315
- 25 F.P.B. van der Maeden, M.E.F. Biemond, P.C.G.M. Janssen  
*J. Chromatogr.* **149** (1978) 539
- 26 S. Teramachi, A. Hasegawa, Y. Shima, M. Akatsuda, M. Nakajima  
*Macromolecules* **12(5)** (1979) 992
- 27 W.J. Staal  
"Gradient Polymer Elution Chromatography", PhD Thesis, Eindhoven University of Technology, The Netherlands, 1996.
- 28 S. Teramachi, A. Hasegawa, Y. Shigekuni, S. Natunaga  
*Polymer J.* **21(10)** (1989) 803
- 29 S. Teramachi, A. Hasegawa, K. Motoyama  
*Polymer J.* **22(6)** (1990) 489
- 30 S. Teramachi, A. Hasegawa, Y. Shigekuni, K. Zenta, H. Hashimoto  
*J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* **45** (1990) 87

- 31 G. Glöckner  
*Chromatographia* **23(7)** (1987) 517
- 32 G. Glöckner  
*Pure & Appl. Chem.* **55(10)** (1983) 1553
- 33 G. Glöckner, D. Ilchmann  
*Acta Polym.* **35(11)** (1984) 680
- 34 G. Glöckner, J.H.M. van den Berg  
*J. Chromatogr.* **384** (1987) 153
- 35 G. Glöckner, M. Stickler, W. Wunderlich  
*Fresenius Z. Anal. Chem.* **328** (1987) 76
- 36 G. Glöckner  
*J. Chromatogr.* **403** (1987) 280
- 37 G. Glöckner, M. Stickler, W. Wunderlich  
*Fresenius Z. Anal. Chem.* **330** (1988) 46
- 38 G. Glöckner, M. Stickler, W. Wunderlich  
*J. Appl. Polym. Sci.* **37** (1989) 3147
- 39 G. Glöckner, H.G. Barth  
*J. Chromatogr.* **499** (1990) 645
- 40 G. Glöckner  
"Gradient HPLC of Copolymers and Chromatographic Cross-Fractionation"  
Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg (1980)
- 41 G. Glöckner  
*J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* **52** (1992) 45
- 42 S. Mori  
*J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* **43** (1989) 65
- 43 S. Mori  
*J. Liq. Chromatogr.* **13(15)** (1990) 3039
- 44 S. Mori  
*J. Chromatogr.* **503** (1990) 411
- 45 S. Mori, H. Taziri  
*J. Liq. Chromatogr.* **17(14&15)** (1994) 3055
- 46 P.J.C.H. Cools, F. Maesen, B. Klumperman, A.M. van Herk, A.L. German  
*J. Chromatogr. A*, **736** (1996) 125

- 47 R.W. Sparidans, H.A. Claessens, G.H.J. van Doremalee, A.M. van Herk  
*J. Chromatogr. A*, **508** (1990) 319
- 48 T. Tanaka, M. Omoto, N. Donkai, H. Inagaki  
*J. Macromol. Sci.-Phys.* **B17(2)** (1980) 211
- 49 M. Augenstein, M.A. Müller  
*Makromol. Chem.* **191** (1990) 2151
- 50 G. Glöckner, J.H.M. van den Berg  
*J. Chromatogr.* **550** (1991) 629
- 51 G. Glöckner, A.H.E. Müller  
*J. Appl. Polym. Sci.* **38** (1989) 1761
- 54 H.J.A. Philipsen, B. Klumperman, A.L. German  
*J. Chromatogr. A* **746** (1996) 211
- 53 S.T. Balke, R.D. Patel  
*J. Polym. Sci. Polym. Lett.* **18** (1980) 453
- 54 P. Kilz, R. P. Krüger, H. Much, G. Schulz  
*ACS Adv. Chem.* **247** (1995) 223
- 55 P. Kilz, R. P. Krüger, H. Much, G. Schulz  
*Polym. Mater. Sci. Eng. Prep.* **69** (1993) 114
- 56 P. Kilz  
*Labor Praxis* **6** (1992) 628
- 57 P. Kilz, R.-P. Krüger, H. Much, G. Schulz  
*Polym. Mater. Sci. Eng.* **69** (1993) 114
- 59 P. Kilz, H. Pasch  
Coupled LC Techniques in Molecular Characterization  
*Encyclopedia of Analytical Chemistry*  
(R. A. Meyers, ed.) Wiley, Chichester (2000), S. 7495-7543
- 60 P. Kilz  
Methods and Columns for High-Speed Size Exclusion  
Chromatography Separations  
*Encyclopedia of Chromatography*  
(Jack Cazes, ed.) Dekker, New York (2001), S. 195-200
- 61 B. Trathnigg  
*Prog. Polym. Sci.* **20** (1995) 650

- 62 H. Pasch, K. Mequanint, J. Adrian  
*e-Polymers* (2002) 005
- 63 H. Pasch  
*Macromol. Symp.* **178** (2002) 25
- 64 T. Chang  
*Adv. Polym. Sci.* **163** (2003) 1
- 65 L.R. Snyder, J.J. Kirkland  
"Introduction to Modern Liquid Chromatography" 2nd ed; John Wiley & Sons, New York, (1979)
- 66 J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, F.J. Klinkenberg  
*A. Chem. Eng. Sci.* **5** (1956) 271
- 67 J.C. Giddings  
*Anal. Chem.* **39** (1967) 1027
- 68 L.M. Davis, J.C. Giddings  
*Anal. Chem.* **55** (1983) 418
- 69 U.D. Neue, J.L. Carmondy, Y-F. Cheng, Z. Lu, C.H. Phoebe, T.E. Wheat  
*Advances in Chromatography* **41** (2001) 93
- 70 L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant  
*J. Chromatogr.* **165** (1979) 3
- 71 L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant  
*J. Chromatogr.* **165** (1979) 31
- 72 J. Houston Smith, dissertation  
*Chromatographic Properties of Silica-Based Monolithic HPLC Columns*  
Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002
- 73 J.H. Knox, P.A. Bristow  
*Chromatographia* **10** (1977) 279
- 74 J.W.D. Ross, R.T. Jefferson  
*J. Chromatogr. Sci.* **8** (1970) 386
- 75 S. Hjérten, J-L. Liao, R. Zhang  
*J. Chromatogr.* **473** (1989) 273
- 76 S. Xie, F. Svec, J.M.J. Fréchet  
*J. Chromatogr.* **775** (1997) 65
- 77 V. Pretorius, J.C. Davidz, D.H. Desty  
*HRC&CC* **2** (1979) 583

- 78 K. Nakanishi, N. Soga  
*J. Non-Cryst. Solids* **139** (1992) 1 und 14
- 79 H. Minakuchi, K. Nakasishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka  
*Anal. Chem.* **68** (1996) 3498
- 80 K. Cabrera, D. Lubda, H-M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi  
*J. High Resol. Chromatogr.* **23** (2000) 93
- 81 M. Schult, D. Lubda, J. Dingenen  
*J. High Resol. Chromatogr.* **23** (2000) 100
- 82 N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka,  
H. Minakuchi, K. Nakasishi, K. Cabrera, D. Lubda  
*J. High Resol. Chromatogr.* **23** (2000) 111
- 83 K. Nakanishi, N. Soga  
*J. Am. Ceram. Soc.* **74** (1991) 2518
- 84 N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Nagayama, H.  
Hosoya, N. Tanaka  
*Anal. Chem.* **72** (2000) 1275
- 85 K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka  
*J. Sol-Gel Sci. Tech.* **8** (1997) 547
- 86 K. Nakasishi  
*J. Porous Maters.* **4** (1997) 67
- 87 K. Cabrera  
*J. Sep. Sci.* **27** (2004) 843
- 88 H. Pasch, P. Kilz  
*Macromol. Rapid Commun.* **24** (2003), 104
- 89 P. Kilz  
*Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*  
C.-S. Wu, Ed., Marcel Dekker, New York, 2002
- 90 J.C. Giddings, E. Kucera, C.P. Russel, N.M. Myers  
*J. Phys. Chem.* **72** (1968) 4397
- 91 M. Adler, Dissertation  
*Entwicklung von chromatographischen Methoden zur Analyse von*  
*hydrophilen synthetischen Copolymeren*  
TU Darmstadt, (2004)

- 92 M. Adler, H. Pasch, C. Meier, R. Senger, H. Koban, M. Augenstein, G. Reinhold  
*e-Polymers* (2004) 055
- 93 M. Adler, H. Pasch, C. Meier, R. Senger, H. Koban, M. Augenstein, G. Reinhold  
*e-Polymers* (2005) 057
- 94 Polymer Standards Service GmbH,  
Persönliche Mitteilung (2003)
- 95 A.V. Gorshkov, H. Much, H. Becker, H. Pasch, V.V. Eveinov, S.G. Entelis  
*J. Chromatogr. A* **523** (1990) 91
- 96 H. Pasch, C. Brinkmann, H. Much, U. Just  
*J. Chromatogr. A* **623** (1992) 315
- 97 W. Batsberg, S. Ndoni, C. Trandum, S. Hvidt  
*Macromolecules* **37** (2004) 2965
- 98 B. Trathnigg, B. Maier, D. Thamer  
*J. Liq. Chromatogr.* **17** (1994) 4285
- 99 K. Baran, S. Laugier, H. Cramail  
*J. Chromatogr. B* **753** (2001) 139
- 100 C. Rappel, B. Trathnigg, A. Gorbunov  
*J. Chromatogr. A* **984** (2003) 29
- 101 B. Trathnigg, A. Gorbunov  
*J. Chromatogr. A* **910** (2001) 207
- 102 B. Trathnigg  
*J. Chromatogr. A* **915** (2001) 155
- 103 B. Trathnigg, M. Kollroser, C. Rappel  
*J. Chromatogr. A* **922** (2001) 193
- 104 B. Trathnigg, C. Rappel  
*J. Chromatogr. A* **952** (2002) 149
- 105 B. Trathnigg, C. Rappel, R. Raml, A. Gorbunov  
*J. Chromatogr. A* **953** (2002) 89
- 106 I. Henze, Dissertation  
*Funktionalitätsanalyse von Oligomeren mit chromatographischen Methoden*  
TU Darmstadt, (1996)



- 107 H. Pasch, W. Hiller  
*Macromolecules* **29** (1996) 6556
- 108 B. Trathnigg, B. Maier, A. Gorbunov, A. Skvortsov  
*J. Chromatogr. A* **791** (1997) 21
- 109 K. Rissler  
*J. Chromatogr. A* **742** (1996) 1
- 110 W. Hiller, A. Brüll, D. Argyropoulos, E. Hoffmann, H. Pasch  
*Magn. Reson. Chem.* **43** (2005) 729
- 111 S.H. Smallcombe, S.L. Patt, P.A. Keifer.  
*J. Magn. Res. Ser. A* **117** (1995) 295
- 112 B. Trathnigg  
*Polymer* **46** (2005) 9211

## CURRICULUM VITAE

### PERSÖNLICHE DATEN

---

**Name:** Adele Brüll (geb. Pienaar)  
**Staatsangehörigkeit:** südafrikanisch  
**Familienstand:** verheiratet

### AKADEMISCHE LAUFBAHN:

---

01/2003 - dato	<b>TU Darmstadt</b> , Deutsches Kunststoff-Institut Promotion
02/2001 – 12/2002	<b>Universität Stellenbosch</b> , Institute for Polymer Science M.Sc (Polymer Science), cum laude
02/1998 – 12/1998	<b>Universität Stellenbosch</b> , Institute for Polymer Science B.Sc (Hons), Polymer Science, cum laude
02/1995 – 12/1997	<b>Universität Stellenbosch</b> B.Sc
01/1990 – 11/1994	<b>C &amp; N Sekondêre Meisiesskool, Oranje</b> , Bloemfontein Senior certificate

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, den